V. MARINESCU
E. PĂUȘESCU
FLORICA NEGREA

Biologia transplantării țesuturilor și organelor

EDITURA MEDICALĂ

Prof. VOINEA MARINESCU,
dr. EXACUSTODIAN PĂUȘESCU,
dr. FLORICA NEGREA

Biologia transplantării țesuturilor și organelor

10496.

EDITURA MEDICALĂ
BUCUREȘTI 1967

Scanned with OKEN Scanner

TABLA DE MATERII

CAPITOLUL I. Pag.

Introducere 11

A. Consideraţii generale asupra transplantării ţesuturilor şi organelor . . . 11
1. Stadiul actual al transplantării organelor în chirurgie 13
Transplantarea rinichiului 14
Transplantarea plămînului 19
Transplantarea inimii 22
Transplantarea ficatului 26
Transplantarea splinei 32
Transplantarea stomacului 35
Transplantarea intestinului 35
Transplantarea arterelor 35
2. Transplantarea ţesuturilor independente 36
Transplantarea glandelor endocrine 36
Transplantarea ţesuturilor hematopoietice 44
Grefele de cornee 48
Transplantarea muşchiului striat 51
Grefele de cartilaj 53

B. Surse de organe şi ţesuturi pentru transplantare la oameni şi aspectele deontologice ale folosirii acestor surse 58
1. Surse de rinichi pentru transplantare 58
2. Surse de inimă pentru transplantare 64
3. Surse de plămîn pentru transplantare 65
4. Surse de ficat pentru transplantare 66
5. Surse de ţesuturi pentru homotransplantele libere 66

C. Principiile conservării organelor şi ţesuturilor pentru transplantare . . . 70
Conservarea rinichiului pentru transplantare 70
Conservarea inimii pentru transplantare 77
Conservarea plămînului pentru transplantare 79
Conservarea ficatului pentru transplantare 79
Conservarea splinei pentru transplantare 80
Conservarea pielii pentru transplantare 80
Conservarea cartilajului pentru transplantare 80
Conservarea nervilor pentru transplantare 81
Conservarea grefoanelor osoase 82
Conservarea corneei pentru transplantare 82
Conservarea vaselor sanguine pentru transplantare 83

D. Probleme experimentale actuale 84

Bibliografie 88

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

CAPITOLUL al II-lea

Aspectele teoretice ale transplantării organelor şi ţesuturilor 101

A. Probleme fundamentale în trasplantarea organelor şi ţesuturilor 101
B. Aspectele genetice ale transplantării de organe şi ţesuturi 103
1. Genele şi transplantarea organelor şi ţesuturilor 103
2. Detectarea antigenelor H pe eritrocite 107
3. Detectarea antigenelor H pe leucocite 107
C. Legile genetice ale transplantării ţesuturilor şi organelor 108
Bibliografie 111

CAPITOLUL al III-lea

Mecanismele imunologice ale transplantării de organe şi ţesuturi 113

A. Imunitatea de transplantare 113
1. Inducerea imunităţii de transplantare 113
2. Stimulul antigenic şi locul reacţiei imune primare 114
3. Specificitatea imunităţii de transplantare 115
4. Natura imunităţii de transplantare 116
5. Răspunsul imun 118
6. Cazuri speciale de imunitate 120
B. Antigenele de transplantare 122
1. Generalităţi 122
2. Celula vie ca antigen de transplantare 128
3. Fracţiunile subcelulare şi extractele celulare ca antigen de transplantare . . 129
4. Proprietăţile antigenice ale nucleilor izolaţi şi ale antigenului nuclear . . 130
5. Proprietăţile fizico-chimice ale antigenului nuclear 130
6. Natura chimică a antigenului nuclear 131
7. Proprietăţile biologice ale antigenului nuclear 136
8. Extractul acelular ca antigen de transplantare şi proprietăţile sale biologice . 137
9. Corelaţia dintre antigenele de transplantare şi antigenele hemaglutinante . 138
10. Componenta lipidică a antigenului de transplantare 141
11. Antigenele leucocitare la diferite specii animale, inclusiv omul şi legătura lor cu antigenele de transplantare 146
12. Antigenele eritrocitare de grup în mecanismele transplantării 153
C. Anticorpii de transplantare 154
1. Anticorpii umorali de transplantare la şoareci 154
2. Anticorpii umorali de transplantare la iepure, şobolan şi cîine 157
3. Anticorpii umorali de transplantare la om 161
4. Anticorpii tisulari 162
5. Rolul anticorpilor umorali în reacţia imunologică de transplantare . . . 171
6. Rolul anticorpilor tisulari în reacţia imunologică de transplantare . . . 174
7. Mecanismul de acţiune a anticorpilor în cursul reacţiei imunologice de transplantare 178
8. Rolul vîrstei în apariţia imunităţii de transplantare 182
D. Rolul sistemului reticuloendotelial în reacţiile de transplantare 183
1. Rolul limfocitelor în procesul de eliminare a homografelor 184
2. Rolul timusului în imunitatea de transplantare şi în procesul de eliminare a homografelor 189
3. Rolul ţesutului conjunctiv în procesul de sensibilizare la homografe . . . 195
E. Mecanismele efectorii în eliminarea ţesutului transplantat 196
F. Reacţiile grefă-contra-gazdă 198
1. Semnele clinice generale ale reacţiilor grefă-contra-gazdă 200
2. Rezistenţa antibacteriană în reacţiile grefă-contra-gazdă 205
3. Căile de administrare şi distribuţia celulelor limfoide ale donatorului în organismul gazdei 206
4. Evoluţia celulelor transplantate ale donatorului în reacţia grefă-contra-gazdă 207

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

5. Relaţiile genetice dintre reacţia de eliminare a grefei şi reacţia grefă-contra-gazdă 209
6. Rolul timusului în reacţia grefă-contra-gazdă 209
7. Reacţii grefă-contra-gazdă cu caracter special 211
8. Tentativele de prevenire sau suprimare a reacţiei grefă-contra-gazdă şi semnificaţiile efectelor lor 216

Bibliografie 222

CAPITOLUL al IV-lea

Aspecte morfopatologice ale transplantării de ţesuturi şi organe 236

A. Vascularizaţia organului transplantat 236
1. Revascularizarea grefelor de piele 236
2. Vascularizarea grefelor de cornee 240
3. Irigaţia organelor viscerale transplantate 241
B. Histologia organelor şi ţesuturilor transplantate 243
1. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului renal 243
2. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului cardiac . . . 257
3. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului pulmonar . . 258
4. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului hepatic . . . 263
5. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului splenic . . . 265
6. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului de muşchi scheletic . 266
7. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului de cornee . . . 266
8. Aspectele morfologice ale eliminării homotransplantului arterial . . . 267
9. Necroza fibrinoidă în eliminarea organelor şi ţesuturilor transplantate . . 268
C. Influenţa ţesutului transplantat asupra altor sisteme şi organe 269
1. Reacţia limfatică generală 269
2. Reacţia limfatică regională 271
3. Leziunile altor organe şi sisteme 273

Bibliografie 275

CAPITOLUL al V-lea

Aspecte biochimice ale transplantării ţesuturilor şi organelor 280

A. Activitatea metabolică a ţesutului transplantat 280
1. Modificările consumului de oxigen în ţesuturile transplantate . . . 280
2. Unele modificări ale structurilor proteice 282
3. Infiltraţia lipidică 285
4. Activitatea enzimatică în ţesuturile transplantate 286
B. Aspecte ale metabolismului leucocitelor la receptorii de organe transplantate 286
C. Modificări umorale ale receptorilor de organe transplantate 292
1. Modificările proteinelor plasmatice 292
2. Variaţiile concentraţiei mucopolizaharidelor şi a triptofanului din plasmă 295
3. Modificări ale activităţii unor sisteme enzimatice 295
4. Indicatori umorali de stress 301

Bibliografie 302

CAPITOLUL al VI-lea

Imunotoleranţa 306

A. Imunotoleranţa biologică activă 306
1. Unele aspecte teoretice ale inducerii imunotoleranţei 309
2. Forme de imunotoleranţă activă dobîndită 318
3. Inducerea imunotoleranţei faţă de un antigen după formarea de anticorpi specifici faţă de acesta 328
4. Imunotoleranţa indusă prin competiţie antigenică specifică 329
5. Consideraţii clinice 331

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

6. Toleranța la transplantare în relație cu imaturitatea imunologică și cu vîrsta 331
7. Imunitatea de transplantare și relațiile materno-fetale 336
8. Condiționarea grefei 342
9. Suprimarea toleranței 345

B. Inducerea artificială a imunotoleranței 345
I. Inducerea farmacodinamică a imunotoleranței 345
1. Actinomicinele 351
2. Hormonii corticoizi 367
3. Acizii nucleici 370
4. α_2-glicoproteinele 370
5. Fenilalanina 370
6. Analogii aminoacizilor 371
7. Mercaptopurina și derivații ei 372
8. Antagoniștii acidului folic 380
9. Derivații acidului caproic 381
10. Diverși alcaloizi 382
11. Agenții alchilanți 382
12. Alți antimetaboliți 385
13. Suprimarea răspunsului imun prin combinații de substanțe imunosupresoare 386
II. Suprimarea răspunsului imun prin agenți fizici 387
1. Iradiația 387
2. Frigul 399

C. Aspecte practice ale inducerii imunotoleranței 400
1. Terapia imunosupresoare 400
2. Compatibilitatea donator-receptor 400
3. Toxicitatea agenților imunosupresori 405
4. Combinațiile sinergice de agenți imunosupresori 406
5. Combinații de agenți imunosupresori și agenți de protecție 406
6. Relația dintre vitamina A și eliminarea homografelor cutanate 407
7. Combinația dintre agenții imunosupresori și circulația încrucișată controlată sau necontrolată dintre donator și receptor 409
8. Imunotoleranța și starea fiziologică 409
9. Tratamentul receptorilor de homo- și heterotransplante renale 409

Bibliografie 411

Scanned with OKEN Scanner

SIMBOLURI ŞI PRESCURTĂRI

ACTH — hormonul adrenocorticotrop
ADP — adenozin-difosfat
ADN — acid dezoxiribonucleic
AM — actinomicină
AMC — actinomicină C
AMD — actinomicină D
AMP — adenozin-monofosfat
ANAN — acid N-acetil-neuraminic
ARN — acid ribonucleic
ASB — albumină serică bovină
ASH — albumină serică umană
Ast — astatiniu radioactiv
ATP — adenozin-trifosfat
DNF — 2,4-dinitrofenol
DPN — difosfopiridin-nucleotid oxidat
DPNH — difosfopiridin-nucleotid redus
FSH — hormonul foliculostimulant
HMC — hidroximetil-citozină
ICSH — hormonul stimulant interstiţiocelular
LDH — dehidrogenaza lactică
Mev — megaelectron-volt
6-MP — 6-mercaptopurină
MSH — hormonul stimulant melanofor
MTX — metotrexat
PAH — para-aminohipurat
PNP — pentozo-nucleoproteine
PVP — polivinil-pirolidonă
*m*ARN — ARN-mesager
*s*ARN — ARN-solubil (de transfer)
SGOT — transaminaza glutamic-oxalacetică
SGPT — transaminaza glutamic-piruvică
SK-SD — amestec de streptokinază şi streptodornază
STH — hormonul de creştere
TEM — trietilen-melamina
Tm — temperatura de tranziţie
TMS — timpul mediu de supravieţuire a grefei
TSH — hormonul tireostimulant

Celelalte simboluri reprezintă tulpini pure de animale de experienţă (de exemplu: şoareci BDF1, şoareci G57BL, şoareci C3Hf etc.).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

INTRODUCERE

A. CONSIDERAŢII GENERALE ASUPRA TRANSPLANTĂRII ŢESUTURILOR ŞI ORGANELOR

În biologie, în împrejurări frecvente, aplicaţii practice deosebite preced încheierea cercetărilor speciale menite să lămurească mecanismele precise, fiziologice şi biochimice, pe care le implică un anumit proces. În ciuda celor peste 200 de ani de utilizare a digitalizării în clinică, şi astăzi a rămas încă obscur modul în care pulberea de digitală modifică excitabilitatea miocardului. Un secol de experienţă clinică asupra anesteziei cu eter nu a fost suficient pentru a revela biochimia acţiunii sale. Terapia insulinică are o vechime de peste 40 de ani, dar cunoştinţele noastre asupra structurii sale chimice şi a acţiunii sale nu sînt satisfăcătoare. Astăzi se explorează utilizarea practică a unor substanţe care afectează activitatea de sinteză proteică şi activitatea mitotică a nucleului celular, dar, pe măsură ce devine evidentă utilitatea lor, apar numeroase probleme de mecanism biochimic care reclamă rezolvarea (344).

Într-o situaţie similară se află şi problemele biologice ale transplantării ţesuturilor şi organelor. De la prima transplantare reuşită a unui organ (rinichiul), efectuată la cîine de Florescu (144) [citat pentru întîietate de Porter şi colab. (409)] şi Carrel şi Guthrie (77), şi pînă la rezolvarea sa clinică a trecut mai mult de o jumătate de veac în care, la evidenţa experimentală considerabilă, s-a adăugat o evidenţă clinică importantă.

Această evidenţă a demonstrat că problema majoră a transplantării organelor şi ţesuturilor este reacţia imunologică în cele două sensuri: de la organismul receptor la grefă şi, invers, de la grefă la organismul receptor. Majoritatea descoperirilor în imunologia de transplantare au la bază studii asupra homotransplantelor „independente“ (libere, fără reconstituirea imediată a sistemului propriu de irigaţie) de piele şi alte ţesuturi şi asupra efectelor injectării unor suspensii de celule viabile.

Numeroase observaţii cu caracter general, efectuate în cursul unor asemenea experienţe, s-au dovedit a fi comune homotransplantelor de organe ale căror anastomoze vasculare au fost asigurate în cursul transplantării (94, 543, 546). Astfel, s-a dovedit în primul rînd că, în mod normal, homotransplantele de organe sînt rejectate (aşa-numita rejecţie de tip *first set*) şi că acest proces se caracterizează prin infiltraţie cu celule limfoide şi prin blocarea gradată,

Scanned with OKEN Scanner

progresivă, a circulației sanguine. În al doilea rînd, s-a observat că, dacă se efectuează transplantarea succesivă a unor organe pereche, ca rinichiul, de la același donator la același receptor, al doilea organ transplantat se rejectează mai rapid decît primul (așa-numita rejecție de tip *second set*), cu condiția ca primul organ transplantat să nu fi fost rezecat înainte de a se fi scurs o anumită perioadă de timp, minimă. În al treilea rînd, s-a arătat că supraviețuirea unor organe homotransplantate poate fi prelungită prin aplicarea unui anumit tratament organismului receptor sau organului transplantat (iradierea totală a organismului, iradierea locală a transplantului, administrarea unor substanțe cu acțiune imunosupresoare etc.). În al patrulea rînd, s-a observat că un organ transplantat în cadrul aceleiași specii poate supraviețui indefinit, dacă receptorul și donatorul sînt gemeni monozigoți sau gemeni dizigoți, care prezintă analogii celulare și serice sanguine (așa-numitul himerism sanguin). În al cincilea rînd, s-a dovedit că organul mai mult studiat (rinichiul canin) conține cel puțin o parte din antigenele de transplantare ale altor organe sau țesuturi, cum ar fi pielea, ceea ce înseamnă că există între acestea o oarecare similitudine antigenică (de exemplu, rejecția unui rinichi homotransplantat este, de regulă, mai rapidă, dacă receptorului i s-a aplicat în prealabil o grefă de piele de la același donator). Recent, Ceppellini și colab. (81) au făcut analiza genetică a histocompatibilității la oameni, pe baza unui model matematic, și au ajuns la concluzia că homotransplantele de piele și rinichi sînt controlate de același sistem imunogenetic.

Din evidența clinică și experimentală actuală reiese de asemenea că homotransplantarea organelor cu realizarea *ab initio* a anastomozelor vasculare corespunzătoare nu este, din punct de vedere imunologic, echivalentă întru totul cu homotransplantarea țesuturilor independente (mușchi striat, glande endocrine etc.) și, ca atare, extrapolarea necontrolată a unor observații rezultate din studiul unui tip de transplant la celălalt tip poate genera concluzii eronate. Astfel, în primul rînd, evoluția unui homotransplant independent este condiționată de modul în care difuziunea fluidelor din spațiile extracelulare ale receptorului în țesutul transplantat, și invers, satisface necesitățile sale metabolice, în timp ce un organ transplantat care dispune de anastomoze vasculare are un regim circulator asemănător celui al organului normal. Acest fapt poate avea implicații imunologice importante și anume:

a) Materialul antigenic eliberat de un transplant tisular, independent imediat după transplantare, pare a fi transportat prin intermediul căilor limfatice ale receptorului, pe cînd cea mai mare parte a materialului antigenic eliberat de un organ transplantat cu anastomoze vasculare corespunzătoare pătrunde în organismul receptorului pe cale sanguină.

b) Procesul de vascularizare a unui homotransplant independent poate realiza înlocuirea unei mari părți a endoteliului vascular al transplantului prin endoteliul vaselor invadante ale gazdei, ceea ce nu se întîmplă cu endoteliile vaselor transplantului anastomozat.

c) Masa țesutului dintr-un organ transplantat este mai mare decît aceea a grefelor tisulare independente și, implicit, această diferență se reflectă asupra cantității de antigen eliberată la un moment dat.

d) În mod curent, un homotransplant tisular independent suferă o necroză centrală avasculară extensivă și, dacă în stadiile tardive transplantul

Scanned with OKEN Scanner

pare a fi supravieţuit se datoreşte faptului că între timp a avut loc o regenerare extensivă a insulelor de ţesut transplantat remanente. În transplantele de organe cu anastomoze vasculare necroza extensivă nu se produce, iar supravieţuirea transplantului nu este în mod obligatoriu legată de regenerarea parenchimului său. Pare puţin probabil ca efectul unor condiţii imunologice asupra organismului sau ţesutului transplantat să fie în întregime independent de amploarea proceselor regenerative care pot avea loc în acest ţesut.

1. STADIUL ACTUAL AL TRANSPLANTĂRII ORGANELOR ÎN CHIRURGIE

În ultima decadă, progresele cercetărilor fundamentale de imunologie şi metodele chirurgicale perfecţionate au apropiat mult era transplantării organelor. Într-adevăr, în ultimii ani s-a trecut de la transplantarea pielii, a corneei sau a oaselor (ţesuturi cu o capacitate antigenică mai mică) la transplantarea organelor interne (rinichi, ficat, plămîni, inimă) la om (124, 184—186, 190, 197, 216, 292, 299, 326, 358, 359, 365, 381, 410, 484—487, 489).

Evoluţia cercetărilor a devenit atît de rapidă în aceşti ultimi ani încît este dificil să se enunţe noi principii fundamentale sau să se susţină unele dintre cele stabilite, cu atît mai mult, cu cît există încă mulţi factori implicaţi în transplantarea organelor şi ţesuturilor care nu sînt suficient cunoscuţi. De la cercetările lui Schwartz şi Dameshek (456), care au arătat pentru prima dată că răspunsul imun la homografele de piele poate fi modificat prin 6-MP, s-au efectuat investigaţii asupra unor substanţe numeroase care s-au dovedit eficace în abrogarea sau atenuarea răspunsului imun la animale şi oameni faţă de antigenele unor ţesuturi diverse. În ciuda multitudinii acestor agenţi imunosupresori, variabilitatea răspunsului la acţiunea lor, al animalelor şi oamenilor purtători de homografe de organe, demonstrează că pentru succesul unor asemenea intervenţii similitudinea genetică dintre donator şi receptor este, probabil, mai importantă decît mijloacele de suprimare a răspunsului imun.

Într-adevăr, patologiştii au întîmpinat serioase dificultăţi în definirea rejecţiei, dat fiind că acest proces este intim legat de modificările patologice care ar putea fi produse de tehnici chirurgicale defectuoase, irigaţie postoperatorie insuficientă şi (sau) infecţie. Poate că cea mai mare deficienţă actuală a încercărilor de prelungire a supravieţuirii unui transplant este lipsa unei metode sensibile, precise, de detectare a iminenţei de rejecţie a acestuia.

Experienţele pe animale sînt fundamentale pentru viitorul acestei probleme medico-biologice; condiţiile aplicării transplantării organelor la om nu trebuie reduse însă numai la încercarea de a stabili o punte între cercetarea de laborator şi practica clinică.

În ultima vreme, transplantarea organelor la om a căpătat un substrat biologic ştiinţific, care a redus mult din hazardul tentativelor iniţiale în acest domeniu.

Prezentarea acestui aspect al problemei trebuie să înceapă în mod logic cu rinichiul, organul care a permis pînă acum cea mai amplă experienţă clinică.

Scanned with OKEN Scanner

Mii de oameni mor în fiecare an din cauza insuficienței renale severe, ireversibile. O formă de tratament introdusă în practica medicală de Quinton și colab. (420) este aceea de a supune bolnavul cu regularitate, o dată sau de două ori pe săptămînă, unei hemodialize, după ce s-a stabilit în prealabil o fistulă arterio-venoasă permanentă, cu o proteză de material plastic, în vederea unei mai simple conectări a bolnavului la rinichiul artificial. Hemodializa repetată este dificilă, foarte costisitoare, neconvenabilă pentru bolnav și fără avantaje de lungă durată; puțini bolnavi au fost menținuți în viață mai mulți ani într-o stare satisfăcătoare cu ajutorul acestei metode.

Soluția terapeutică alternativă, adică homotransplantarea rinichiului, a fost impusă de ineficacitatea sau eficacitatea limitată a metodei menționate.

Prima transplantare renală la om a fost făcută în 1954 între doi gemeni monozigoți (318, 363) și abia după 4 ani s-a realizat aceeași intervenție la gemeni dizigoți (317, 361). Cîțiva ani după aceea s-au transplantat cu succes primii rinichi de la mamă (186), rudă (461) și donatori neînrudiți (261). Toți receptorii de rinichi, cu excepția cazului gemenilor monozigoți, au fost iradiați cu doze subletale, pentru a suprima răspunsul imunologic față de antigenele grefei. Aceste succese (succesul fiind definit prin supraviețuirea receptorului mai mult de 1 an) au fost totuși temporare, pentru că funcția rinichiului transplantat s-a redus în mod progresiv.

Introducerea substanțelor imunosupresoare în tratamentul bolnavilor cu homotransplant renal (74, 455, 559) a condus la instituirea precoce a unei funcții mai bune a homografei, indiferent de sursa sa. Supraviețuirea prelungită a rinichiului uman, prelevat de la cadavru și transplantat sub tratament cu substanțe imunosupresoare, a permis ca numărul unor asemenea tentative clinice să crească (319, 360, 365). După aceea, s-a constatat că terapia imunosupresoare poate face reversibilă o reacție de rejecție declanșată (354) și că există chiar cazuri de remisiune spontană a rejecției homotransplantului renal (230, 183, 557). Experiența clinică a lui Starzl și colab. (489) a impus ablația splinei receptorului o dată cu transplantarea rinichiului, dar beneficiul splenectomiei pare a dispare rapid (362). Iradierea receptorului nu a fost părăsită definitiv, recurgîndu-se în unele cazuri la asocierea substanțelor imunosupresoare cu iradierea locală a grefei (216).

Lucrările recente ale lui Murray și colab. (355—357) în care sînt însumate cazurile de transplantare a rinichiului la om, au stabilit că, pînă la 15. III. 1965, numărul intervențiilor chirurgicale intreprinse în acest scop a atins cifra de 729 și că la această dată se aflau în stare de funcțiune 282 de rinichi homotransplantați (primar, secundar sau terțiar). Amănunte în legătură cu rezultatele acestor lucrări statistice se află în tabelul 1. Din acest tabel reiese în mod evident că ultimii ani au însumat un număr triplu de tentative de homotransplantare a rinichiului uman.

Cu o selecție corespunzătoare a cazurilor și un tratament postoperator bine condus, 30—50% din bolnavii purtători ai unui homotransplant renal pot supraviețui 1 an, iar perspectiva unei supraviețuiri mai îndelungate, deși nu este neglijabilă, este încă foarte mică (545). Acest eveniment a fost dublat de o înmulțire a lucrărilor experimentale, factorul major responsabil de inten-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Situaţia homotransplantelor de rinichi umani la 15. III. 1965, întocmită pe baza perioadei în care s-a realizat intervenţia chirurgicală, a sursei rinichilor transplantaţi şi viabilităţii acestor transplante

Donatorul	Numărul transplantelor de rinichi efectuate				
	În total	Înainte de 16.III.1963	Între 16.III.1963 şi 15.III.1964	Între 16.III.1964 şi 15.IX.1964	Între 16.IX.1964 şi 15.III.1965
Mamă	127	15 (2)*	56 (24)	35 (22)	21 (15)
Tată	50	10 (1)	23 (11)	8 (6)	9 (6)
Soră	48	9 (3)	22 (14)	7 (5)	10 (7)
Frate	54	11 (2)	24 (15)	12 (6)	7 (5)
Alte rude de sînge	12	2 (1)	6 (4)	2 (2)	2
Soţ (soţie)	13	5	5 (1)	2	1 (1)
Voluntari neînrudiţi	38	6	18 (3)	4 (1)	10 (6)
Nefrectomizaţi obligatoriu	44	20	14 (3)	6	4 (1)
Cadavre	241	45 (1)	63 (10)	51 (16)	82 (43)
Gemeni monozigoţi	36	27 (19)	5 (4)	3 (3)	1 (1)
Gemeni dizigoţi	9	3 (3)	3	2 (1)	1
Total	672 (268)	153 (32)	239 (89)	132 (62)	148 (85)
Transplante renale secundare					
	45 (13)	3	15 (2)	12 (5)	15 (6)
Transplante renale terţiare					
	2 (1)	—	—	—	2 (1)

* Numerele din paranteze indică transplantele renale viabile la 15.III.1965. (După Murray şi colab.) (357)

sificarea cercetării ştiinţifice şi a intervenţiilor clinice în acest domeniu fiind descoperirea substanţelor cu acţiune imunosupresoare (68, 315, 456, 457, 559).

Pe lîngă problemele fundamentale de genetică şi histocompatibilitate privind mecanismul rejecţiei organului transplantat, inducerea imunotoleranţei la adult şi perfecţionarea mijloacelor de suprimare a răspunsului imun, pe asemenea modele experimentale, s-au făcut cercetări deosebite în domenii cu consecinţe practice imediate ca: a) selecţia donatorilor prin teste de histocompatibilitate; b) conservarea grefelor; c) prevenirea şi tratamentul consecinţelor indezirabile ale substanţelor imunosupresoare şi ale iradiaţiei, în special aplazia medulară, infecţia, vascularitele şi tulburările de coagulare cu fenomene trombo-embolice.

În ciuda efortului depus, starea actuală a inducerii imunotoleranţei cu mijloacele imunosupresoare cunoscute nu reprezintă soluţia completă a problemei rejecţiei rinichiului transplantat.

La aceasta se adaugă lipsa unor metode specifice de detectare a iminenţei de rejecţie a homotransplantului renal. Aceasta poate fi uneori dedusă din semne clinice (febră, stare de disconfort în regiunea transplantului, sensibilitate crescută a acestei zone, tumefierea sau edemul tegumentului regiunii, anorexie, cefalee, stare generală alterată şi scăderea debitului urinar) sau din teste standard de laborator (creşterea concentraţiei sanguine a azotului ureic,

Scanned with OKEN Scanner

a creatininei, reducerea *clearance*-ului creatininei, leucocitoză sau leucopenie şi uneori hematurie microscopică (fig. 1). Hume şi colab. (216, 217) şi Kaufman şi colab. (243) citează ca test util de laborator şi apariţia în număr mare a celulelor epiteliale tubulare şi a limfocitelor în urină, evidenţiabile prin colorarea sedimentului urinar. Aceşti autori pretind că, în experienţe pe cîini cu homotransplant renal, au constatat, la 24 de ore după pătrunderea limfocitelor în spaţiile interstiţiale ale rinichiului transplantat, că ele pot fi detectate în lumenul tubilor colectori şi în sedimentul urinar (fig. 2 şi 3). Aceiaşi autori (216) susţin că la oamenii cu homotransplant renal, la care limfocitele sînt evidenţiabile în urină, ele dispar după tratament imunosupresor. Taft şi Flax (504) au arătat că prezenţa celulelor epiteliale tubulare în sedimentul urinar este edificatoare pentru rejecţia rinichiului, dacă se menţine peste 2 săptămîni de la transplantare. Înainte de acest termen, ea poate avea numai semnificaţia unor leziuni tubulare reversibile şi nespecifice, produse de ischemia temporară a organului în timpul transplantării. De asemenea, a fost descrisă creşterea eritropoietinei în sînge în cursul episoadelor de rejecţie renală (222, 373). Alte teste aplicabile rinichiului transplantat ar fi exagerarea activităţii DH în serul sanguin şi urină şi urmărirea radiologică a dimensiunilor rinichiului transplantat, folosind în acest scop agrafe de argint implantate sub capsulă, la polii rinichiului şi la jumătatea curburii externe dintre cei doi poli (217). Creşterea activităţii LDH în ser nu este însă edificatoare în primele 2 săptămîni de la transplantare, cînd poate fi provocată de însăşi traumatismul operator, nefiind astfel specifică rinichiului; această creştere poate fi constatată numai în ser, nu şi în urină, ceea ce apare ca o condiţionare a procesului imunologic, lezării altor organe etc.

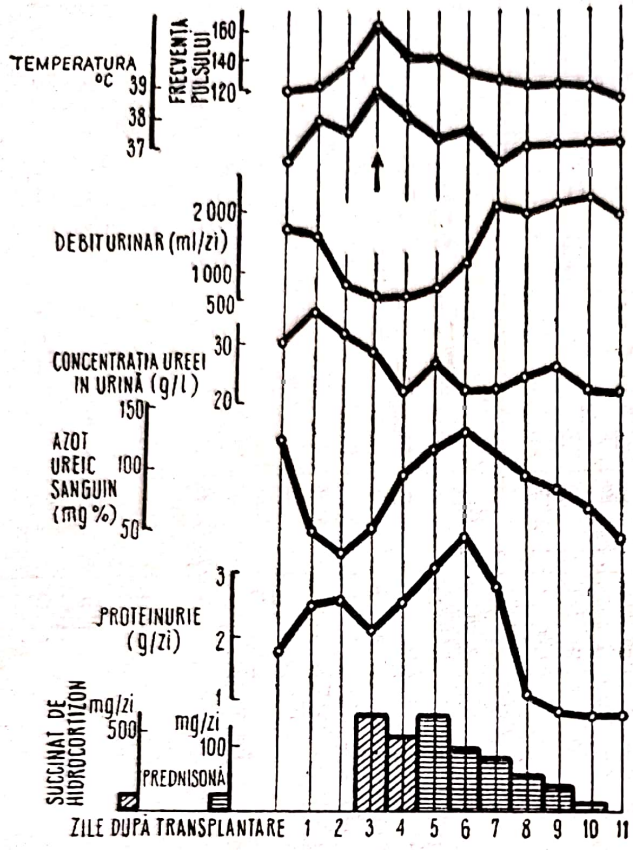


Fig. 1. — Criza precoce a unui bolnav cu homotransplant renal
[după Hamburger şi colab. (183)].

Recent, Joseph (239) a observat că răspunsul în culturi al leucocitelor sanguine faţă de fitohemaglutinină (creşterea dimensiunilor celulare, basofilia citoplasmei, mitoze — fig. 4) este obişnuit la bolnavii cu homotransplant renal, fie că ei se află sau nu într-un episod de rejecţie. Această observaţie a pus sub semnul întrebării afirmaţia lui Rubin şi colab. (439), potrivit căreia culturile de celule sanguine provenind de la bolnavi cu homotransplant renal

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 2. — Sedimentul urinar colorat al unui bolnav cu homotransplant renal în rejecţie moderată conţine numeroase limfocite:
[după Hume şi colab. (217)].

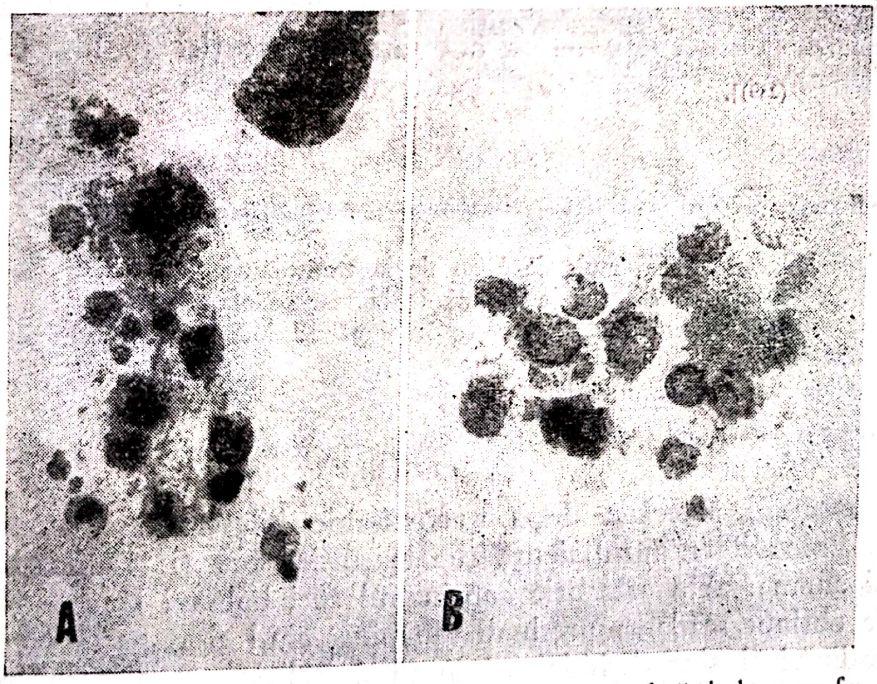


Fig. 3. — Sedimentul urinar în a 5-a zi după reacţia faţă de homografa renală a unui bolnav:
A — celule tubulare renale cu aspect mitotic la un pol. De-a lungul celulelor tubulare se află leucocite polimorfonucleare şi limfocite; *B* — celule tubulare renale cu citoplasma vacuolată (× 675) [după Taft şi Flax (504)].

Scanned with OKEN Scanner

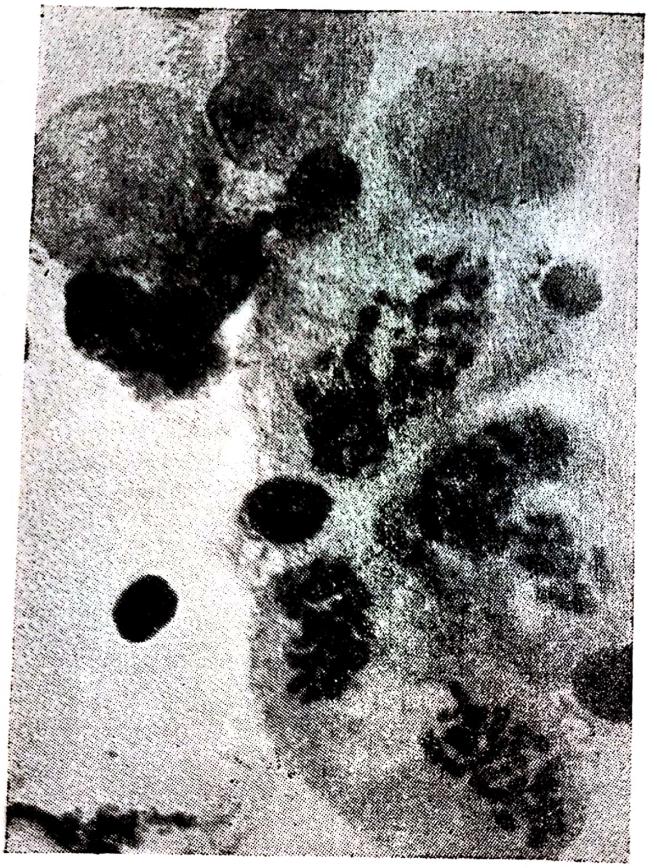


Fig. 4. — Celule sanguine ale unui bolnav cu homotransplant renal, păstrate în mediu de cultură cu fitohemaglutinină.

De remarcat trei celule în metafază şi trei celule mari cu nucleoli proeminenţi. Cultura a fost realizată din celule prelevate în a 5-a zi de tratament cu actinomicină C (May-Grunwald-Giemsa × 1 500) [după Joseph şi colab. (239)].

răspund mai slab la fitohemaglutinină dacă ei nu se află în iminenţă de rejecţie, în comparaţie cu aceleaşi culturi de celule provenind de la oameni normali sau de la bolnavi cu homotransplant renal în rejecţie.

Collins şi Wilson (92), analizînd renogramele efectuate în serie la 21 de bolnavi cu homotransplant renal, au ajuns la concluzia că această metodă de investigaţie este preţioasă ca mijloc adjuvant de evaluare a funcţiei transplantului renal, mai ales cînd se suspectează obstrucţia ureterală, necroza tubulară acută sau infarctizarea grefei.

Criterii de evaluare a eficacităţii transplantării rinichiului. În privinţa rinichiului, supravieţuirea după transplantare este un fapt asupra căruia se poate interveni deseori în mod eficace. Nimeni nu poate fi încă în situaţia de a şti cu certitudine care va fi evoluţia unui rinichi homotransplantat, dar cîteva criterii aproximative de evaluare a eficacităţii intervenţiei au fost fixate (tabelul 2).

Tabelul 2

Criterii privind evaluarea eficacităţii transplantării rinichiului *

1. Supravieţuirea bolnavului mai mult de 1 an de la transplantare.
2. Lipsa iminenţei de rejecţie în primele 6 luni de la transplantare.
3. Funcţionarea normală a rinichiului transplantat după 12 luni de la transplantare.
4. Valori normale ale activităţii LDH în ser.
5. Lipsa infecţiilor urinare semnificative.

* După Hume şi colab. (217)

Hipertensiunea arterială după nefrectomie bilaterală şi transplantarea rinichiului. Bolnavii cu insuficienţă renală severă pot fi clasificaţi în două categorii şi anume: a) o categorie cuprinzînd acei bolnavi la care este destul de uşor de obţinut scăderea presiunii sanguine, cînd ei respectă un regim de 500 mg sodiu/zi şi sînt deshidrataţi în mod judicios cu ajutorul rinichiului artificial, şi b) o categorie de bolnavi la care nu se poate obţine acest lucru, şi

Scanned with OKEN Scanner

care intră într-o stare care oscilează între hipertensiune și hipotensiune ortostatică.

Avînd în vedere această situație, Nakamoto și colab. (367) au emis ipoteza că hipertensiunea renală are două componente: o componentă renoprivă, care nu este afectată de nefrectomia bilaterală, și o componentă renală (foarte probabil reprezentată de renină), care este abolită prin nefrectomie. Ca atare, nefrectomia bilaterală înlătură componenta renală și reduce hipertensiunea arterială la forma de hipertensiune renoprivă, sensibilă la un regim corespunzător de sare și apă. Transplantarea cu succes a rinichiului rezolvă hipertensiunea renoprivă, bolnavii devenind treptat normotensivi și, invers, eliminarea rinichiului transplantat agravează hipertensiunea prin intervenția unor factori umorali, celulari sau vasculari (fig. 5).

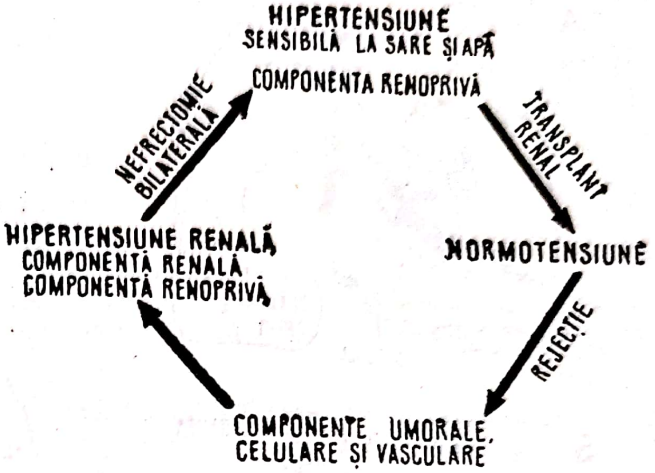


Fig. 5. — Evoluția hipertensiunii arteriale după nefrectomie bilaterală și transplantarea rinichiului: [după Nakamoto și colab. (367)].

TRANSPLANTAREA PLĂMÎNULUI

O intensă activitate de investigație experimentală s-a desfășurat de asemenea în problema homotransplantării plămînului, avîndu-se în vedere eventualitatea clinică a unor situații în care ambii plămîni au fost afectați în mod extensiv și ireparabil de traumatisme, boli degenerative sau inflamatoare, neoplasme sau boli congenitale cardiace, asociate cu modificări vasculare pulmonare ireversibile.

De la primele încercări de homotransplantare a lobilor pulmonari, întreprinse de Demihov (112) în 1947 și încercările sale ulterioare de homotransplantare a plămînilor în întregime sau a plămînilor împreună cu inima, s-au efectuat numeroase cercetări în acest domeniu nu numai pentru rezolvarea unor probleme biologice (46, 48, 65, 110, 130, 531), ci și pentru soluționarea problemelor tehnice, deosebit de dificile, ale transplantării acestor organe (43, 51, 61—64, 85, 108, 286). Lucrările lui Staudacher și colab. (490), ale lui Lanari și colab. (262, 263) și ale lui Metras (323) sînt bine cunoscute. Autotransplantarea și reimplantarea plămînului (3, 4, 50, 191, 192, 215, 240, 273) s-au dovedit procedee de o deosebită valoare în rezolvarea tulburărilor provocate de anomaliile structurilor hilare. Efectul auto- și homotransplantării plămînului asupra funcțiilor sale a fost studiat de numeroși autori (14, 27, 28, 66, 131, 374—377, 411, 427, 432, 526, 540, 552). S-au efectuat observații interesante asupra modificărilor histologice ale plămînului transplantat (6, 16, 33) și asupra consecințelor respiratorii ale denervării sale totale (12, 133, 134, 193, 214, 462, 529). S-au încercat variate modalități de suprimare a răspunsului imun, uneori cu rezultate apreciabile (49, 188, 291, 370, 371, 520).

Capacitatea plămînului transplantat de a prelua întreaga sarcină respiratorie a fost testată printr-o mare varietate de procedee (126, 180, 181, 266, 473, 556). În cîteva ocazii homotransplantarea pulmonară s-a intreprins în clinică (181, 292, 412). În figura 6 este schematizată tehnica chirurgicală folosită de

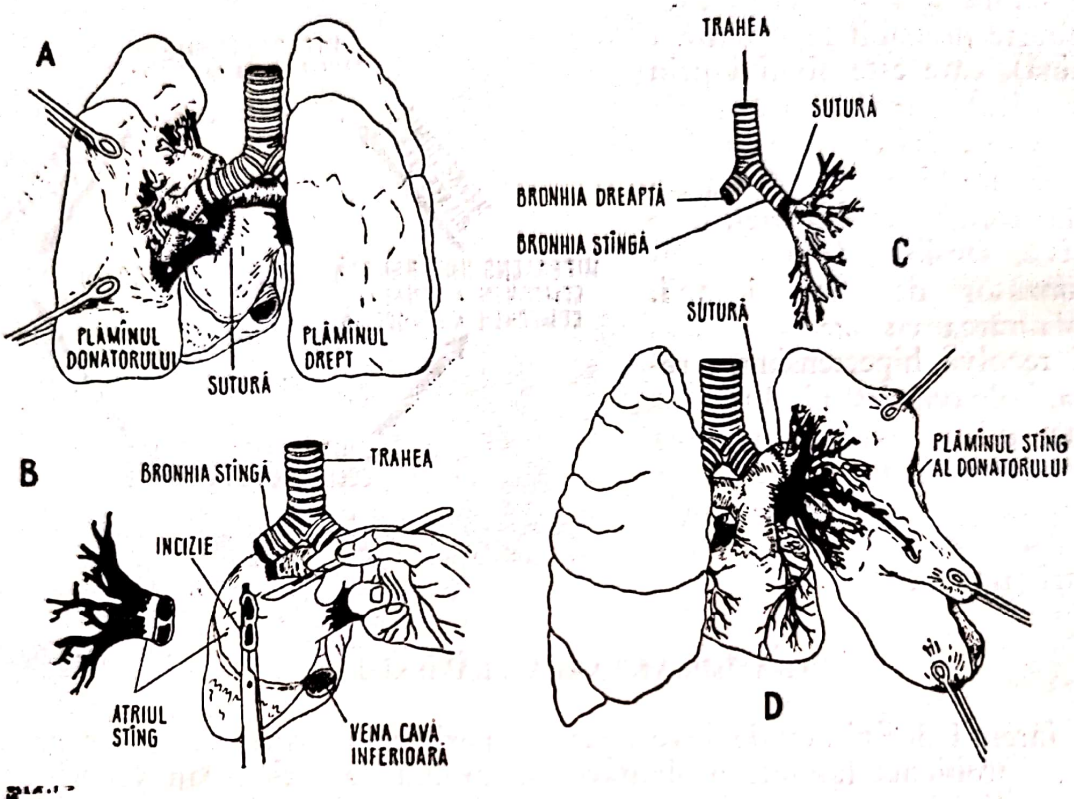


Fig. 6. — Schema tehnicii chirurgicale de transplantare a plămînului stîng, folosită de Magovern şi Yates (292) la om:

A — vedere posterioară a anastomozelor atrială, bronşică şi arterială (artera pulmonară); *B* — pregătirea locului de anastomoză dintre atriul stîng şi venele pulmonare; *C* — sutura bronşică văzută din faţă; *D* — vedere anterioară a plămînului transplantat; *negru* — venele pulmonare; *alb* — artera pulmonară.

Magovern şi Yates (292) pentru transplantarea plămînului stîng la un bolnav de 44 de ani cu insuficienţă gravă, ireductibilă, de oxigen. Cîteva amănunte tehnice din această intervenţie sînt de reţinut: a) venele pulmonare s-au prelevat cu un inel de ţesut miocardic din jurul *ostium*-ului lor, pentru ca să se asigure mai multă trăinicie acestei suturi; b) plămînul receptorului s-a prelevat cu segmente lungi din bronhia principală şi artera pulmonară; c) anastomoza bronşică a fost făcută cu fire separate şi consolidată cu o piesă din burete de teflon. Supravieţuirea acestui homotransplant pulmonar uman a fost de 7 zile, iar cea mai lungă supravieţuire a plămînului transplantat la om, citată în literatură, a fost de 18 zile (197).

Homografele pulmonare se rejectează în 6—10 zile, dacă nu se încearcă suprimarea răspunsului imun (45, 204, 372).

S-au efectuat de asemenea cercetări asupra posibilităţilor de a se transplanta un singur lob pulmonar (149, 372), intervenţie care oferă o seamă de avantaje pentru aplicarea la om. În figura 7 este prezentată schematic posi-

Scanned with OKEN Scanner

bilitatea de a asigura irigaţia independentă a lobului pulmonar transplantat: aorta donatorului este secţionată deasupra şi sub locul de emergenţă a arterelor bronşice, iar segmentul aortic se prelevează o dată cu lobul pulmonar inferior al acestuia. După aceea se fac anastomozele arteriale, venoase şi bronşice termino-terminal, cu excepţia segmentului aortic prelevat o dată cu lobul pulmonar al donatorului, care se suturează latero-lateral la aorta receptorului. Permeabilitatea vaselor unui lob pulmonar transplantat în acest mod a fost verificată prin injectare *post mortem* a preparatului (372).

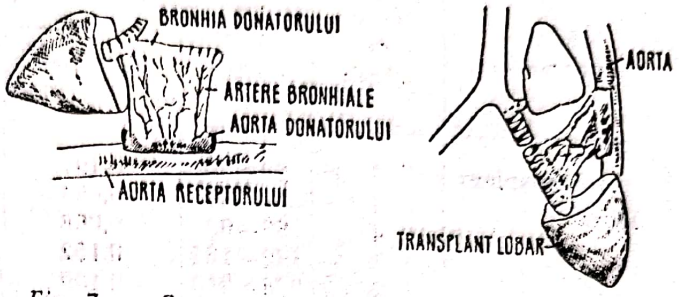


Fig. 7. — Segment aortic al donatorului anastomozat latero-lateral cu aorta descendentă a receptorului pentru a asigura irigarea unui homotransplant de lob pulmonar la cîine [după Nettleblad şi colab. (372)].

Avantajele clinice ale transplantării parţiale (un lob) a plămînului sînt: a) dacă donatorii în viaţă urmează a fi selecţionaţi potrivit unor similitudini antigenice cu receptorul, atunci se vor găsi mai uşor donatori de lob pulmonar decît donatori de plămîn în întregime; b) utilizarea transplantării unui singur lob ar permite degrevarea funcţională a organului transplantat în perioada postoperatorie imediată; c) lobul intact al gazdei ar putea servi ca mijloc de mediere către lobul transplantat a reflexelor neurogenice normale, care reglează respiraţia; d) un singur lob pulmonar transplantat, aflat în stare de funcţiune, ar putea asigura o ventilaţie suficientă pentru a evita deficitul de oxigen al receptorului.

Problema tehnică majoră a homotransplantării lobului pulmonar sau a plămînului în întregime este frecvenţa mare a trombozelor la nivelul anastomozelor venoase pulmonare (3, 108, 372, 378) pentru înlăturarea cărora s-au imaginat diverse procedee, însă cu rezultate minime (372).

Rolul sistemului arterial bronşic în asigurarea nutriţiei parenchimului pulmonar după transplantare nu a fost stabilit precis pînă acum. Huggins (215) a constatat, în experienţe de autotransplantare a lobului pulmonar inferior stîng, că, dacă bronhia se divide la o distanţă de sub 10 mm de parenchimul pulmonar, nu se produce necroza acesteia şi că, dimpotrivă, dacă distanţa de parenchim la care ea se divide este de 15—20 mm, se produc frecvent necroze bronşice. În acest ultim caz este necesar să se execute tehnica de conservare a irigaţiei bronşice (figura 7), care este mai complicată, necesită mult timp şi prezintă riscul unor sîngerări postoperatorii grave. Segmentele bronşice scurte pot fi irigate bine prin colateralele arterei pulmonare.

Funcţia pulmonară, evaluată prin capacităţile de a capta oxigenul şi de a elimina bioxidul de carbon, nu este alterată profund în autotransplantul pulmonar (134, 372, 378, 427) şi după 2 luni de la operaţie se restabileşte aproape complet (tabelul 3).

În homotransplantul de lob pulmonar aflat sub tratament imunosupresor, funcţia respiratorie pare a fi numai parţial afectată: captarea de oxigen nu diferă în lobul pulmonar homotransplantat faţă de lobul contralateral cores-

Tabelul 3

Captarea de oxigen şi eliminarea de bioxid de carbon în lobi pulmonari auto- şi homotransplantaţi la cîine *

Lotul experimental	Număr de animale	Zile după operaţie	Captarea de oxigen (l/min.)		Eliminarea de bioxid de carbon (l/min.)	
			Transplant (lob. inf. stîng)	Control (lob. inf. drept)	Transplant (lob. inf. stîng)	Control (lob. inf. drept)
Autotransplant lobar	7	23—30	0,197	0,220	0,058	0,061
	4	30—47	0,094	0,116	0,071	0,081
	4	86—99	0,068	0,450	0,088	0,055
	3	142—154	0,152	0,139	0,092	0,081
	2	208—210	0,139	0,120	0,094	0,067
	Media	—	0,138	0,153	0,064	0,067
Homotransplant lobar	1	162	0,084	—	0,084	—
	1	193	0,131	0,193	0,067	0,108
	1	296	0,115	0,150	0,061	0,114
	Media	—	0,110	0,171	0,070	0,111

* La grupele de animale cu autotransplant lobar, fiecare valoare reprezintă media grupului (după Nettleblad şi colab.) (372).

punzător, dar eliminarea de bioxid de carbon se reduce cu peste 40% (tabelul 3). În plămînul homotransplantat este însă tulburată şi captarea oxigenului (427).

TRANSPLANTAREA INIMII

Cu toate că transplantarea inimii a suscitat un interes mai mare decît transplantarea plămînilor sau a rinichilor, inima fiind organ unic (121, 298, 369, 450, 532, 537), dificultăţile tehnice şi viabilitatea ei de scurtă durată după transplantare, consemnate în cercetări experimentale, au impus suficientă rezervă pentru ca tentativele clinice în legătură cu această intervenţie să se reducă la un singur caz (190).

Transplantarea ortotopică a inimii a fost socotită imposibilă atît din considerente chirurgicale, cît şi din considerente fiziologice, şi poate că şi din acest motiv ea este privită astăzi ca o problemă cu totul specială. Nu este exclus ca în cazul unei anumite categorii de afecţiuni ale inimii, metodele de supleere a funcţiei sale pentru scurtă durată, disponibile astăzi, să permită excizia inimii, corectarea defectelor sale în afara organismului şi resuturarea la locul său, întocmai ca în cazul autotransplantării; asemenea procedee ar fi indicate în împrejurări ca refacerea unor valve cardiace sau tratamentul ocluziei coronariene. Transplantarea inimii, implicaţiile acestei intervenţii fiind foarte vaste, nu se va impune în practica clinică decît dacă, înainte de a se fi rezolvat problemele imunologice ale transplantării, se va reuşi inserarea intra-

toracică a unei inimi artificiale satisfăcătoare, capabilă să substituie sau să ajute funcţia inimii normale.

Carrel şi Guthrie (76) au transplantat întîia oară inimi de căţei în regiunea cervicală a unor cîini adulţi, acest model experimental, modificat mai

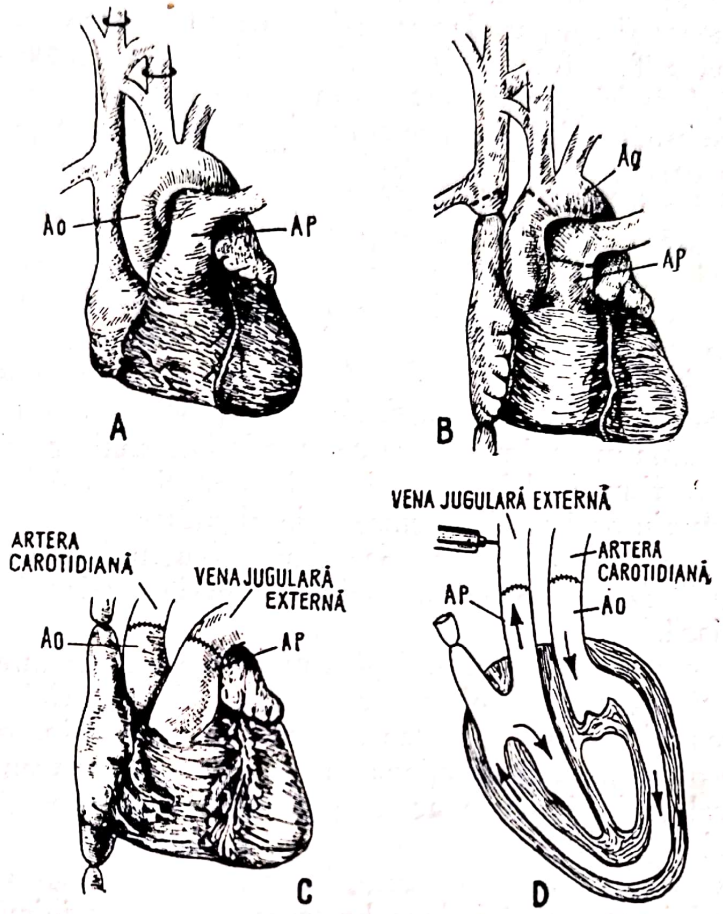


Fig. 8. — Schema transplantării heterotopice a inimii. Prepararea inimii de căţel (*B*) pentru a fi transplantată la gîtul unui cîine (*A*): artera carotidă şi vena jugulară ale inimii receptorului sînt pregătite; inima donatorului este prelevată după izolarea şi ligaturarea venelor cave şi a venelor pulmonare şi separarea aortei de vena cavă superioară. Aorta şi artera pulmonară ale grefei sînt anastomozate, respectiv, cu artera carotidă şi vena jugulară ale receptorului (C). Circulaţia sîngelui în inima transplantată heterotopic (*D*) [după Mann (293].

tîrziu de Mann şi colab. (293), păstrîndu-şi exclusivitatea pentru studii fiziologice asupra inimii transplantate timp de aproape 50 de ani (fig. 8). În 1960 cu ajutorul aparatului inimă-plămîn artificial şi folosind o metodă de hipotermie locală pentru protecţia miocardului anoxic şi o tehnică originală de anastomozare venoasă, Lower şi Shumway (284) au rezolvat partea chirurgicală a problemei.

Din punct de vedere tehnic, transplantarea inimii oferă unele avantaje în comparaţie cu transplantarea altor organe. Vasele sanguine, chiar dacă este vorba de inimi mici, sînt suficient de mari pentru ca anastomozele vasculare

să se execute fără dificultate. Mărimea vaselor permite de asemenea instalarea unor mijloace de măsurare a debitului sanguin al grefei și de prelevare a probelor de sînge din vasele sale aferente și eferente. Perioada de supraviețuire funcțională a inimii transplantate poate fi evaluată cu mai multă precizie decît în cazul altor organe, iar efectul inimii transplantate asupra inimii receptorului poate fi studiat electrocardiografic. De aceea, transplantul heterotopic de inimă a fost folosit de mulți autori (84, 121, 289), a fost adoptat pentru cercetări de irigație și metabolism al grefei (422), pentru testarea capacității unor substanțe imunosupresoare de a prelungi supraviețuirea homotransplantului cardiac (428) și pentru studii electrocardiografice asupra inimii transplantate și a inimii autohtone (421).

Însă, din cauza eliminării homografei cardiace, studiile fiziologice cele mai ample asupra inimii transplantate au fost efectuate mai ales pe modele experimentale cu autotransplant cardiac, care au furnizat supraviețuitori de lungă durată (464, 539). Denervarea acută a inimii are, în mod surprinzător, puține efecte nefavorabile, iar pe de altă parte, reinervarea unei asemenea inimi se realizează într-o perioadă mai scurtă de 2 ani (464). Aceste efecte nefavorabile se produc pe seama mecanismelor de conducție intramiocardică (bloc incomplet atrioventricular, ritm nodal, stop sinuzal, atac Stokes-Adams) (222) și pot fi controlate cu ajutorul unui pacemaker implantat.

Față de cele prezentate, este de admis că numai problema imunologică, nerezolvată încă, face să eșueze tentativele experimentale sau clinice de transplantare cardiacă.

Pe lîngă această problemă biologică majoră, transplantarea cardiacă ridică de asemenea cîteva alte probleme: conservarea inimii pînă la transplantare, asigurarea circulației după transplantare, fenomenele de interdependență funcțională cardio-pulmonară și selecționarea cazurilor pentru transplantarea inimii. Asupra celei dintîi dintre aceste probleme se va reveni într-o altă secțiune a acestui capitol.

Asigurarea circulației după transplantarea inimii. Adesea este necesar ca circulația sîngelui receptorului după homotransplantarea inimii să fie preluată, cel puțin parțial, de un alt sistem circulator. Este rațional să se admită că necesitatea de a sprijini activitatea contractilă a unei inimi transplantate este invers proporțională cu gradul de protecție a grefei înainte de transplantare. Dacă inima transplantată se află într-o condiție funcțională precară, necesitățile de asistență circulatorie a receptorului pot impune o sursă suplimentară de energie, așa cum se poate întîmpla și cu rinichiul. În cazul cînd, de exemplu, homotransplantul renal nu-și reia funcția decît la cîteva zile după transplantare, receptorul este supus de obicei uneia sau mai multor dialize extrarenale. În mod similar, s-ar putea rezolva această problemă și în cazul inimii. Folosirea temporară a unei inimi artificiale intra- sau extratoracice sau chiar a unei circulații încrucișate, controlată, în perioada imediat consecutivă transplantării, ar putea constitui o modalitate de a asigura circulația receptorului. Este de asemenea posibilă, din punct de vedere chirurgical, plasarea lîngă inima receptorului a unei inimi auxiliare (fig. 9). Teoretic, o asemenea inimă și-ar putea asuma o parte din sarcina circulatorie a inimii receptorului.

În prezent, numeroase investigații sînt îndreptate spre găsirea unor metode de asistență eficace a inimii transplantate, care nu poate face față imediat

Scanned with OKEN Scanner

nevoilor circulatorii ale gazdei. Pe baza experienței clinice se poate afirma că inima anoxică răspunde favorabil la asistența prelungită cu aparatul inimă-plămîn artificial. Deconectarea timpurie de la aparatul de circulație extracorporeală a receptorului, după transplantarea inimii, pare să fie responsabilă de numeroasele cazuri de insuficiență cardiacă acută postoperatorie, observate în experiențe pe animale. Cel puțin 3 ore de perfuzie totală artificială a organismului se pot efectua astăzi în condiții de securitate cu aproape oricare dintre tipurile existente de aparate inimă-plămîn artificial. În afara acestor limite arbitrare, gazda ar putea fi, probabil, asistată fără anestezie, cu toracele închis și canule vasculare periferice *à demeure*.

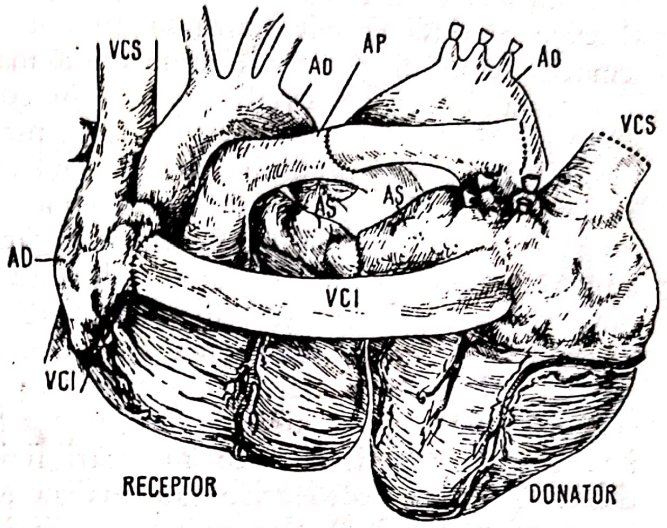


Fig. 9. — Schema grefării unei inimi auxiliare.
Vena cavă inferioară a grefei este anastomozată cu atriul drept al inimii receptorului. Cele două urechiușe stîngi, ale inimii autohtone și ale grefei, sînt conectate, iar artera pulmonară și aorta grefei sînt anastomozate, termino-lateral, respectiv cu artera pulmonară și aorta inimii receptorului [după Reemtsma (421)].

Interdependența cardio-pulmonară în condițiile transplantării inimii. Între inimă și mica circulație există o interrelație unică. S-ar putea spune că, în condiții de transplantare, nici un organ nu este atît de dependent de alt organ cît este inima cu plămînul. Această dependență este condiționată pe de o parte de faptul că inima este un mare consumator de oxigen, iar pe de altă parte de faptul că ea reglementează capacitatea plămînului de a furniza acest oxigen. Numeroși bolnavi cu insuficiență cardiacă primară, la care transplantarea unei inimi este indicată, prezintă tulburări funcționale sau leziuni pulmonare secundare.

Hipertensiunea pulmonară, de gradul celei întîlnită de obicei în cazul complexului Eisenmenger, pune problema transplantării inimii și unui plămîn. Abolirea totală, acută, a controlului nervos al respirației este tolerată greu, dar păstrarea unui plămîn al gazdei ar evita în parte consecințele unei asemenea intervenții. Astfel se explică multitudinea încercărilor de a se transplanta inima împreună cu ambii plămîni. Asemenea animale, cu transplant cardio-pulmonar, au trăit pînă la 5 zile (286). Foarte interesant este faptul că rejecția pulmonară în aceste cazuri a fost violentă, în timp ce rejecția cardiacă a fost relativ temperată. La aceste animale, reluarea respirației spontane după operație a avut caracterul aceleia semnalată după vagotomia cervicală bilaterală.

Semne precoce ale rejecției homotransplantului cardiac. Pînă acum nu s-au stabilit precis semnele precoce ale rejecției homografei de inimă. Investigațiile inițiale asupra electrocardiogramei după transplantarea inimii nu au adus rezultatele scontate. Modificări semnificative ale electrocardiogramei, constînd din alterarea segmentului *ST* și a undei *T*, fără afectarea complexului *QRS*, apar abia la 7—10 zile de la transplantarea heterotopică a

inimii (421), acesta fiind singurul semn care ar putea fi folosit în prezent pentru studiul fenomenului de eliminare a miocardului. Starea clinică a receptorului, în cel mai bun caz un indicator grosolan, este semnul cel mai folosit pentru rejecția cardiacă. Restabilirea condițiilor hemodinamice preoperatorii ar fi un asemenea criteriu, însă între depresiunea funcțională primară a inimii și aceea produsă de eliminarea sa nu s-au stabilit corelații certe. Unul dintre semnele cărora li se acordă importanță mai mare este aritmia cardiacă, mai ales aceea de origine atrială (464), fapt de altfel ușor de acceptat, dat fiind că atriile sînt constituite dintr-un țesut mai puțin dens și, ca atare, mai susceptibil de a suferi timpuriu invazia celulelor gazdei. Shumway și Lower (464) au menținut inimi transplantate la cîine, în stare funcțională mulțumitoare, timp de 7—21 de zile, fără tratament imunosupresor. Folosirea substanțelor imunosupresoare poate prelungi toleranța receptorului adult față de grefă pînă la 40—50 de zile sau chiar 8 luni (283), dar, în cazul administrării unor doze mari, reacția imunologică este deprimată global și receptorul poate fi pierdut prin infecții. Se preconizează în prezent posibilități variate de a măsura intensitatea procesului de eliminare a homotransplantului cardiac (metode imunologice, metode chimice, măsurări fiziologice ale debitului cardiac și ale debitului sanguin coronarian sau analiza modificărilor electrocardiografice de la un minut la altul), dar nu s-a stabilit încă validitatea metodelor încercate.

TRANSPLANTAREA FICATULUI

Pînă nu de mult, homotransplantarea ortotopică a ficatului în întregime a fost o operație decepționantă atît la animal, cît și la om. Operația însăși implică un risc imediat mare, mai ales la cîine, care s-a dovedit un model experimental dificil, atunci cînd trebuie să intervină anoxia hepatică. În majoritatea tentativelor de homotransplantare a ficatului la cîine, animalele nu au putut fi recuperate din faza acută a traumatismului operator, ceea ce a făcut imposibil și studiul eficacității tratamentelor imunosupresoare asupra procesului de eliminare a ficatului.

În ultimul timp, datorită cercetărilor sistematice ale lui Starzl și colab. (480, 482, 486) și Moore și colab. (345, 346, 347), s-au stabilit principii tehnice, care au permis să se efectueze homotransplantarea hepatică. Unul dintre acestea este instituirea unui *by-pass* extern între vena cavă inferioară și vena cavă superioară, care are rostul de a descongestiona sistemele venei cave inferioare și venei porte ale receptorului, anastomozate între ele și închise temporar, în cursul implantării ficatului (fig. 10). Anastomozele vasculare se execută într-o anumită ordine (vena cavă superioară, vena cavă inferioară, artera hepatică, vena portă), după care anastomoza porto-cavă, temporară, se desființează în așa fel, încît irigația ficatului transplantat să se facă normal. Drenajul biliar se asigură prin colecistoenterostomie.

După transplantarea ficatului, aproximativ 50% din animale mor în primele 3 zile, adică înainte de a deveni manifeste primele semne de eliminare a organului (la 4—6 zile după operație) (259, 347, 482). Recent, Starzl și colab. (488) au comunicat cazuri de supraviețuire a unor cîini cu transplant hepatic ortotopic între 25 și 324 de zile, bineînțeles sub tratament cu azatio-

Scanned with OKEN Scanner

prină. Mortalitatea postoperatorie și semnele de rejecție sînt condiționate de durata ischemiei hepatice în cursul operației de transplantare (tabelul 4).

Încercările de a transplanta la cîine acest organ, recoltat de la alți cîini sacrificați și supuși hipotermiei cu ajutorul perfuziei artificiale, începînd de

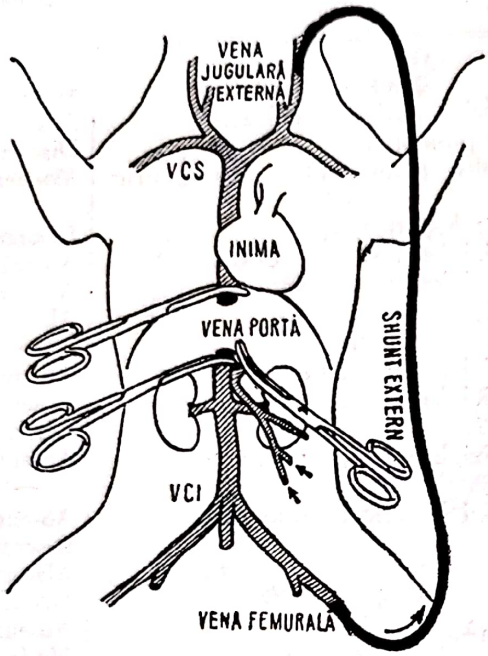


Fig. 10.

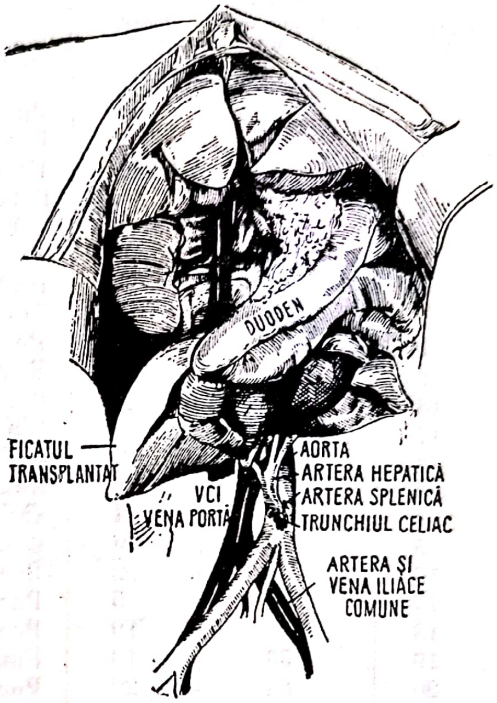


Fig. 11.

Fig. 10. — Sistem de *by-pass* extern, folosit în cursul homotransplantării ortotopice a ficatului canin.

O anastomoză temporară porto-cavă se instituie înainte de realizarea acestui *by-pass*, pentru a pune în comunicație sistemul venei porte și sistemul venei cave inferioare. Un singur *by-pass* extern este suficient pentru a realiza descongestionarea acestor sisteme din perioada în care este necesară ocluzia venoasă la nivelurile de suturare. Anastomoza porto-cavă este înlăturată după plasarea ficatului în circuitul sanguin respectiv [după Starzl și colab. (481)]

Fig. 11. — Tehnica de realizare a unui homotransplant hepatic auxiliar.

Artera hepatică este anastomozată termino-lateral la aortă, ca în acest caz, sau termino-terminal la artera iliacă comună stîngă. Vena portă este anastomozată la capătul terminal al venei cave inferioare, iar venele suprahepatice (cu un fragment de venă cavă) la capătul proximal (infrarenal) al venei cave inferioare [după Goodrich și colab. (168)]

la 5 pînă la 22 de minute după sacrificare, au dat rezultate nesatisfăcătoare, mortalitatea postoperatorie imediată fiind de 50%, durata maximă a supraviețuirii de 4 zile, iar modificările umorale și histologice dovedind afectarea hepatică gravă (295, 486).

Transplantarea heterotopică a ficatului, după metoda lui Goodrich și colab. (168), are avantajul de a permite efectuarea unor homografe hepatice auxiliare (fig. 11). La acest tip de transplantare hepatică nu s-au semnalat complicațiile trombotice sau de blocaj a circulației hepatice, prezente în cazul transplantării ortotopice, vena portă nu se obstruează decît rar, artera hepatică și mai rar, iar timpul de supraviețuire depășește 20—30 de zile. Marchioro și colab. (296) au arătat că supraviețuirea grefelor hepatice heterotopice este

Tabelul 4

Rezultate clinice şi histologice ale transplantării ortotopice a ficatului la cîine *

Numărul experienţei	Durata ischemiei ficatului în cursul transplantării (min.)	Supravieţuirea animalelor (zile)	Cauza morţii	Modificări histologice de eliminare
1	65	11	Pneumonie	Moderate
2	75	1	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
3	62	25	Pneumonie; edem pulmonar	Discrete
4	52	31	Pneumonie; embolie pulmonară; ulcer gastric perforat	Moderate
5	66	9	Pneumonie; abcese hepatice	Discrete
6	64	1	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
7	60	2	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
8	90	2	Pneumonie	Absente
9	103	12	Ruptura colecistoenterostomiei	—
10	82	1	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
11	106	0	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
12	66	12	Ocluzie intestinală	Discrete
13	82	1	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
14	68	4	Ocluzie intestinală	—
15	85	0	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente
16	66	12	Pneumonie	Discrete
17	87	5	Pneumonie	Absente
18	56	19	Pneumonie	Moderate
19	56	13	Embolie pulmonară	Absente
20	64	20	Pneumonie	Moderate
21	75	1	Blocaj al circulaţiei pulmonare; hemoragie	Absente
22	54	9	Pneumonie	Discrete
23	63	2	Blocaj al circulaţiei pulmonare; hemoragie	Absente
24	55	7	Pneumonie; abcese hepatice	—
25	64	1	Blocaj al circulaţiei hepatice; hemoragie	Absente

* După Starzl şi colab. (486)

condiţionată într-o mare măsură de debitul venos al organului. La cîini, cu asemenea grefe hepatice (anastomozele au fost făcute, respectiv, între secţiunile de arteră hepatică, venă portă şi venă cavă ale ficatului donatorului şi secţiunile de arteră iliacă, venă mezenterică superioară şi venă cavă ale receptorului), aceşti autori au ligaturat vena portă a primitorului fie deasupra tributarei sale principale, permiţînd ficatului transplantat accesul primar la debitul venos splanhnic, fie imediat sub joncţiunea sa cu vena splenică, divizînd debitul splanhnic între ficatul autohton şi ficatul transplantat. Astfel, ei au observat că în prima circumstanţă experimentală, ficatul auxiliar a susţinut organismul receptorului 8—49 de zile după hepatectomie. La aceeaşi concluzie au ajuns şi Tretbar şi colab. (516), care au observat că în cazul homotransplantului hepatic auxiliar pelvin un shunt cavo-portal înlătură riscul atrofiei organului.

Cu toate că homotransplantele hepatice heterotopice prezintă semnele unei evidente permeabilităţi vasculare, organul îşi reduce în timp volumul, iar hepatectomiile efectuate la animalele cu homotransplant hepatic auxiliar la

Scanned with OKEN Scanner

20—30 de zile de la transplantare duc la insuficiență gravă, rapidă a acestuia (486).

Tentativele clinice de homotransplantare hepatică au fost puțin numeroase, iar soluția tehnică aleasă a fost transplantul ortotopic (fig. 12), dat

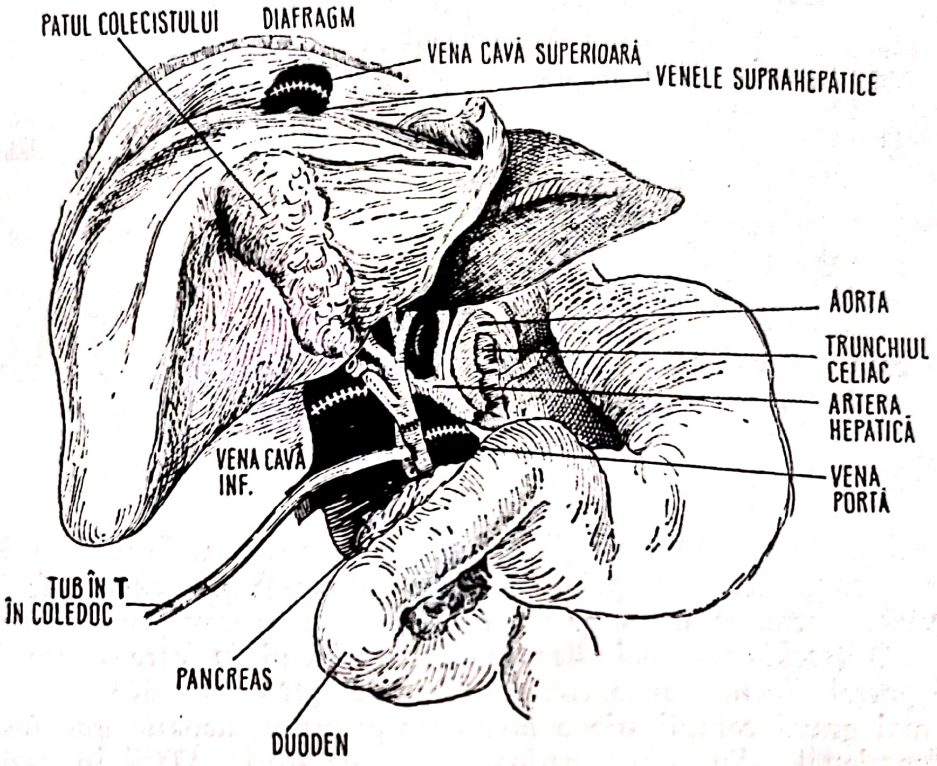


Fig. 12. — Conexiunile anastomotice în homotransplantarea hepatică umană ortotopică.

A se nota că un tub în T a fost montat în porțiunea restructurată a canalului coledoc al receptorului [după Starzl și colab. (486)]

fiind că starea ficatului propriu reclama ablația (tumori hepatice, atrezia congenitală a căilor biliare) (486, 487). Transplantarea ficatului la om este, poate, o necesitate mai imperioasă decît transplantarea renală, dat fiind că, deși cazurile de insuficiență hepatică severă, ireversibilă, sînt mai puțin numeroase, nu dispunem încă de o metodă alternativă de tratament. În tabelul 5 sînt prezentate cîteva observații clinice privind homotransplantarea ficatului la om.

Homografa hepatică umană se rejectează mai greu decît homografa hepatică la cîine; ischemia ficatului pe durata transplantării are consecințe mai puțin grave la om decît la cîine. Această observație subliniază posibilitatea de a folosi pentru transplantare ficatul bolnavilor care au murit recent de altă cauză.

Complicațiile postoperatorii imediate ale transplantării ficatului. Spre deosebire de transplantarea ficatului la cîine, la om au loc postoperator complicații mai variate și mai grave (ulcerații gastro-intestinale, hemoragii gastro-intestinale, embolii pulmonare, exsudate pleurale masive, sindrom fibrinolitic, tromboze extensive, edem cianotic dureros al membrelor inferioare) (486).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Date clinice privind homotransplantul hepatic la om *

Număr cazuri	Vîrsta donatorului şi a receptorului	Afecţiunea receptorului	Grupa sanguină a donatorului şi a receptorului	Durata de la moartea donatorului pînă la irigarea ficatului (min.)	Durata supravieţuirii receptorului (zile)	Cauza morţii receptorului
1	3— 3	Atrezie biliară	A+—A+	420	0	Hemoragie intraoperatorie
2	55—48	Ciroză şi tumoare hepatică	A+—A+	152	22	Embolie pulmonară
3	69—67	Colangio-carcinom	O—O+	192	7	Embolie pulmonară; hemoragie
4	73—52	Ciroză şi tumoare hepatică	O+—A—	174	6	Embolie pulmonară; insuficienţă cardiacă
5	64—29	Ciroză şi tumoare hepatică	O+—O+	164	23	Peritonită biliară

* După Starzl şi colab. (486)

Unele dintre aceste complicaţii la om sînt atenuate de instituirea *by-pass*-ului extern, temporar, intraoperator, între sistemul venei cave inferioare şi sistemul venei porte pe de o parte şi sistemul venei cave superioare pe de alta (fig. 10) (reclamată mai ales în cazul cîinelui la care congestionarea sistemului portal are totdeauna consecinţe grave) (226, 345, 505).

Cea mai gravă complicaţie a homotransplantului hepatic este însă insuficienţa funcţională din prima perioadă postoperatorie. Dacă în cazul rinichiului, ca urmare a simplităţii sale funcţionale, este posibil ca o asemenea eventualitate să fie rezolvată folosindu-se mijloace artificiale (489), în cazul ficatului, complexitatea sa funcţională nu permite o astfel de substituţie. Fiind mare numărul de procese metabolice vitale care ar trebui să fie înlocuite, mortalitatea ridicată după hepatectomie şi homotransplantarea ficatului este mai curînd efectul incapacităţii receptorului de a rezista în cursul insuficienţei acute reversibile a ficatului transplantat decît efectul unei evoluţii rapide a procesului de rejecţie. Această afirmaţie este atestată de faptul că, la animalele care mor în această fază, parenchimul homografei hepatice îşi conservă structura (fig. 13). Este posibil ca o soluţie pentru această perioadă să fie menţinerea ficatului receptorului, hepatectomizarea sa urmînd a se efectua după ce homografa şi-a reluat funcţiile; evidenţa actuală arată că, cel puţin o lună după transplantare, homografa nu este în stare să asigure viabilitatea receptorului (486).

Din cercetările privind eliminarea ţesutului hepatic transplantat, în afara oricărui tratament imunosupresor (59, 168, 259, 310, 347, 466, 482), reiese că, în ciuda unor investigaţii metabolice care atestă starea nealterată a celulei hepatice chiar la cîteva ore după moarte (467, 468), ischemia prelungită a ţesutului hepatic condiţionează insuficienţa sa funcţională în prima perioadă postoperatorie. O ischemie hepatică mai mare de 120 de minute duce la un eşec aproape sigur al transplantării (481).

Scanned with OKEN Scanner

În cazul homotransplantării ficatului uman, tulburările de coagulabilitate sanguină din perioada postoperatorie sînt mai frecvente, mai deosebite şi mai grave decît după homotransplantarea ficatului canin. Hipercoagulabilitatea

Fig. 13. — Homografă hepatică ortotopică la un cîine, care a murit în perioada postoperatorie iniţială.
A se observa absenţa infiltratului celular, care ilustrează procesul de rejecţie [după Starzl şi colab. (486)].

sanguină, care se instalează tardiv în cazurile clinice, nu a fost întîlnită în experienţe pe animale, unele tulburări discrete ale acestui proces fiind descrise însă şi la cîine. Este interesant de semnalat că animalele purtătoare de homotransplant hepatic auxiliar prezintă în mod invariabil creşteri pronunţate ale nivelului plasmatic al fibrinogenului în cursul primelor cîteva zile după operaţie, sugerînd că în această perioadă homografa traversează o fază de sinteză proteică intensă (259).

Soluţia terapeutică a acestor probleme de discrazie sanguină la om (sîngerarea iniţială şi tendinţa tardivă la tromboze) nu a fost stabilită încă, dar se preconizează, cu oarecare rezerve, heparinizarea sistematică postoperatorie şi renunţarea la administrarea fibrinogenului sau a acidului ε-aminocaproic, dacă în cursul intervenţiei nu se manifestă clinic fibrinoliză.

Şi, în sfîrşit, un alt aspect practic al transplantării ficatului este conturat de toxicitatea tuturor substanţelor imunosupresoare cunoscute. Administrarea lor *per os* amplifică această acţiune din cauza concentraţiei crescute a substanţei, realizată în circulaţia portală. Acest fapt reclamă găsirea unor forme superioare de imunosupresiune în cazul homotransplantelor hepatice, mai puţin hepatotoxice. Combinaţia dintre un medicament imunosupresor, administrat parenteral, şi iradierea locală pare pentru momentul de faţă soluţia terapeutică cea mai potrivită.

Scanned with OKEN Scanner

Din cauza efectului său potențial asupra elementelor figurate ale sîngelui, splina a fost tratată cu un deosebit interes în cercetările privind biologia transplantării organelor și țesuturilor. Experiențele pe animale mici s-au limitat numai la inocularea intravenoasă a unor suspensii de splenocite sau a unor omogenate din acest țesut (141, 225, 231, 547), transplantarea întregului organ efectuîndu-se la animale mari, în primul rînd la cîine. Majoritatea acestor experiențe au urmărit efectul modificării stării imunitare a organismului asupra răspunsului său la iradiere (105, 142, 143, 236, 238, 272). Clinic, s-au efectuat homotransplantări ale splinei pentru a se dota organismul receptorului cu țesut activ imunologic (în cazuri de hipogammaglobulinemie cu scopul de a atenua această stare de deficiență imunologică, iar în cazuri de tumori maligne cu scopul de a modifica reactivitatea imunologică a gazdei și, deci, de a opri invazia tumorală) (167, 297); beneficiul acestor intervenții a fost însă aproape nul. Asemenea insuccese ar apărea inexplicabile, dacă se ține seama că Good și colab. (167) au obținut o creștere trecătoare a nivelului sanguin al γ-globulinelor după homotransplantarea ganglionilor limfatici și că Woodruff (547), ca și Fiscus și colab. (141) au prezentat date pe baza cărora se poate presupune că transplantarea splinei ar putea iniția o reacție grefă-contra-gazdă, cu selectivitate pentru celulele tumorale. Singura explicație posibilă a eșecului de a rezolva prin homotransplantare splenică situațiile clinice menționate ar fi neutralizarea activității formatoare de anticorpi a țesutului transplantat prin substanțele utilizate în scopul de a suprima eliminarea sa. Rifkind și colab. [citați de (297)] au arătat că bolnavii cu homotransplant renal, supuși unor condiții farmacologice similare, prezintă o depresiune marcată a γ-globulinelor serice.

Cu toate aceste insuccese, tentativele de transplantare a splinei sînt justificate nu numai din cauza numeroaselor implicații ale transplantării unui țesut imunocompetent, ci și pentru că prelevarea unei spline de la un donator se poate face în afara unor situații dificile și fără consecințele grave ale prelevării altor organe.

S-a încercat de asemenea prelungirea supraviețuirii homografelor renale canine prin splenectomie și homotransplantare splenică și s-a obținut în acest caz o medie de supraviețuire a rinichiului transplantat de aproximativ 20 de zile față de 10—11 zile (media supraviețuirii homotransplantelor renale simple, fără tratament imunosupresor) (252, 297). Este interesant de semnalat că, pe baza unor criterii histologice, s-a stabilit nereciprocitatea relațiilor dintre aceste două homografe: homografa renală nu pare a influența homografa splenică (297). Experiențele pe animale cu homotransplant dublu, renosplenic, au arătat că țesutul splenic este mult mai susceptibil de a fi atacat imunologic decît cel renal, dat fiind că splina este mai frecvent și mai puternic dezorganizată structural decît rinichiul provenit de la același donator. O explicație a acestei observații ar fi că splina are o antigenicitate mai mare decît rinichiul.

Un grup important de observații se referă la efectele nocive pe care grefele de țesut limfoid le pot avea asupra gazdei. Aceste observații trebuie ținute în seamă cînd se întreprind asemenea aplicații (transplantarea măduvei osoase sau a altor țesuturi limfoide). Cel mai puternic efect nociv în acest caz

Scanned with OKEN Scanner

este dezvoltarea unui proces hemolitic, care este agravat mult de expunerea prealabilă a organismului la radiații. Hemoliza apare uneori și la animale purtătoare ale unui homotransplant splenic, după tratamentul cu substanțe

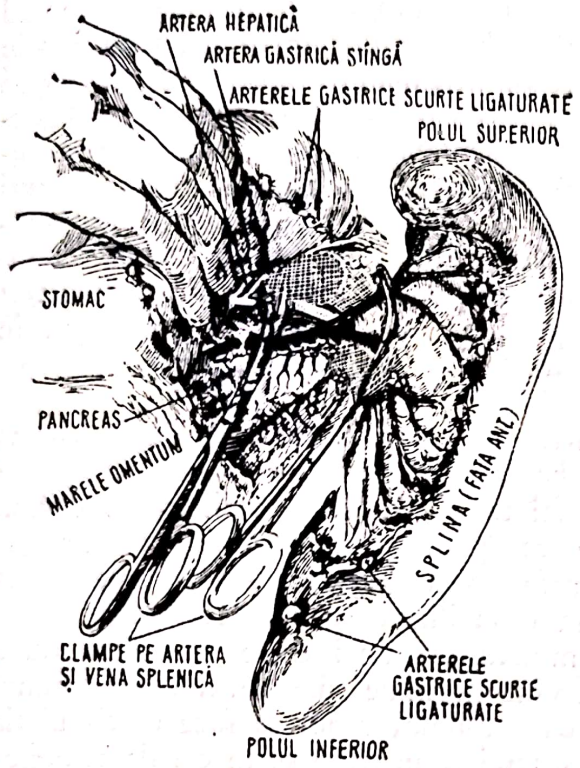


Fig. 14.

Fig. 14. — Tehnica splenectomiei pentru transplantare la cîine.

Vasele gastrice scurte sînt ligaturate și secționate, iar cele două vase principale, artera și vena splenică, sînt izolate [după Marchioro și colab. (297)].

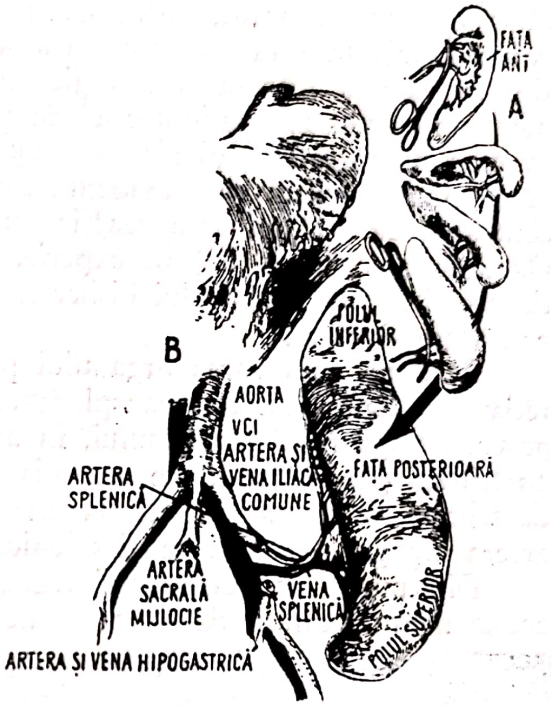


Fig. 15.

Fig. 15. — Tehnica de revascularizare a homografei splenice canine:

A se nota implantarea excentrică a pediculului vascular în corpul splenic. Rotația splinei în jurul pediculului său vascular permite să se sutureze acest pedicul la artera și vena iliacă comune cu mai multă ușurință [după Marchioro și colab. (297)].

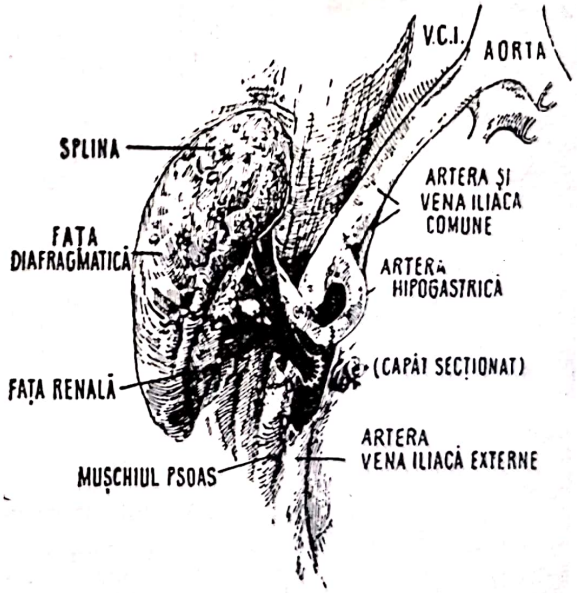


Fig. 16.

Fig. 16. — Tehnica de plasare a unei homografe splenice umane:

Splina este rotată în așa fel încît fața sa posterioară să devină anterioară [după Marchioro și colab. (297)]

imunosupresoare. Natura acestui proces hemolitic nu a fost elucidată. Fiscus și colab. (142) au conchis, pe baza unor numeroase observații, că mecanismul hemolizei provocată de homotransplantarea splinei se reduce, de fapt, la o

reacție grefă-contra gazdă cu hipersplenism. Totuși, este imposibil de corelat această presupusă activitate patologică a splinei cu procesul normal al formării splenice de anticorpi. Este mai probabil ca sechestrarea hematiilor în homografele splenice și hemoliza care a fost observată aici să fie mai curînd consecința procesului de eliminare splenică decît a exagerării capacității sale de a distruge hematiile printr-un mecanism imunologic. Datele lui Fisher și colab. (143), care au arătat că la animale și om homografele splenice în rejecție prezintă o intensă hemoragie intraparenchimatoasă, constituie un argument important în sprijinul celei de a doua ipoteze. De altfel, se citează cazuri în care homografele splenice au supraviețuit lung timp, hemoliza fiind prezentă, fără a exista vreo evidență asupra existenței unei reacții cronice grefă-contra-gazdă. O asemenea reacție nu este imposibilă, așa cum au demonstrat Dammin și colab. (105) în experiențe pe cîini; observațiile lor sînt însă în dezacord cu observațiile lui Fisher și colab. (143), care au folosit modele experimentale similare.

La cîine, prelevarea organului pentru transplantare se face după schema redată în figura 14, iar transplantarea heterotopică se face la nivelul vaselor pelvine, după rotația organului, în așa fel încît fața sa posterioară să devină anterioară (fig. 15). La om, metoda de transplantare heterotopică a splinei se deosebește de aceea folosită la cîine prin anastomozarea arterei splenice la artera hipogastrică și a venei splenice la vena iliacă externă (fig. 16).

Din punct de vedere fiziologic, implantarea unei grefe de splină după aceste metode diferă de situația unei spline normale, dat fiind că în primul caz drenajul venos se face în circulația sistemică, în timp ce în cel de al doilea caz se face în circulația portală. Se poate efectua și transplantarea ortotopică a splinei (238).

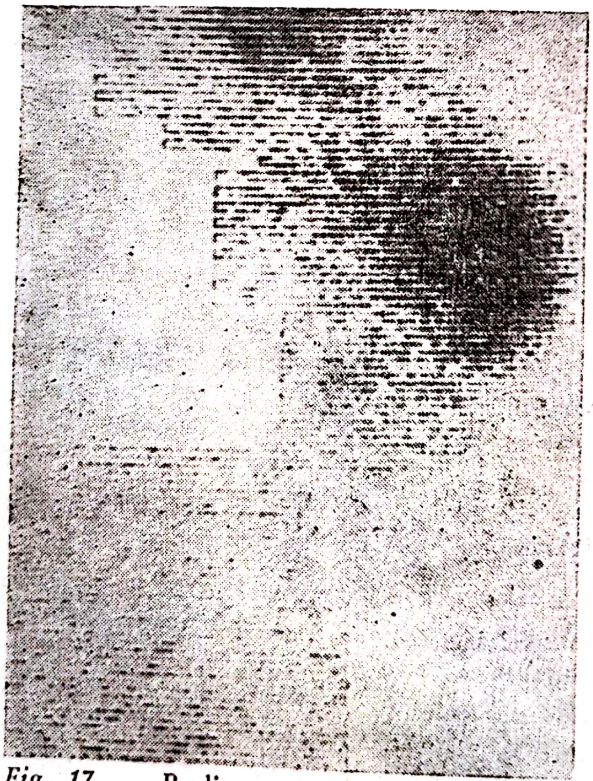


Fig. 17. — Radiogramă izotopică a splinei umane, obținută la 3 luni după homotransplantare.
Nu se observă o concentrație apreciabilă a radioactivității în dreptul homografei splenice (stînga jos) [după Marchioro și colab. (297)].

O altă metodă la care s-a recurs pentru a investiga consecințele transplantării splinei este așa-numita splenoză (238). Animalele normale pot dezvolta splenoză după ruptura traumatică a splinei, cu răspîndirea intraperitoneală a unor elemente parenchimatoase ale acesteia. În vederea reproducerii experimentale a acestui model, după splenectomia gazdei, se introduc în cavitatea peritoneală fragmente de țesut splenic recoltate de la un donator oarecare. Acest procedeu nu duce la modificări hematologice semnificative sau la alterarea stării generale a animalelor, deși resorbția totală a acestor fragmente se face în mai puțin de 2 săptămîni.

Supraviețuirea homotransplantului splenic este greu de evaluat, pentru că

Scanned with OKEN Scanner

splina este un organ silenţios din punct de vedere funcţional. Două semne, totuşi, par a fi caracteristice acestui proces şi anume: hiperpirexia şi edemul indurat al plăgii, care pot simula infecţia, ambele semne remiţîndu-se prompt după administrarea prednisonei (60 mg/zi). O radiogramă izotopică cu brom-mercurihidroxipropan marcat cu ^{197}Hg (524) poate arăta sechestrarea sau lipsa sechestrării radioactivităţii la nivelul homotransplantului splenic (fig. 17). Aceşti indicatori ai eliminării splenice sînt totuşi inadecvaţi pentru conducerea zilnică a terapiei imunosupresoare; sînt deci necesare alte determinări de laborator, care să măsoare specific activitatea splinei transplantate.

În general, splina transplantată se elimină în 8—10 zile (105, 297). După tratament cu substanţe imunosupresoare (azatioprină, prednisonă), homografa splenică poate supravieţui la om 10—12 luni (297).

TRANSPLANTAREA STOMACULUI

În scopul de a studia mecanismele secreţiei acide fundice au fost efectuate şi homotransplantări gastrice parţiale heterotopice la cîine, media supravieţuirii acestor grefe fiind 5,1 zile fără tratament imunosupresor şi 12,7 zile sub un asemenea tratament (510).

TRANSPLANTAREA INTESTINULUI

Transplantarea intestinului ar fi indicată în acele cazuri în care pierderea unei mari părţi a intestinului subţire, cum se întîmplă în ocluzia vaselor mezenterice, ar periclita viaţa bolnavului. Transplantarea acestui organ nu a devenit însă o precupare importantă a cercetătorilor în domeniul transplantării. Ea nu ar prezenta prea multe dificultăţi tehnice, iar materialul necesar ar putea fi obţinut cu siguranţă de la donatori în viaţă.

Pînă acum au fost făcute homografe de intestin la cîini de către Lillehei şi colab. (270, 271), care au observat că, dacă se transplantează anse jejunale la gîtul acestor animale, eliminarea transplantului are loc după 6—9 zile. Preston şi colab. (415) au studiat secreţia acestor homografe şi schimburile lor electrolitice. În cazul unor asemenea grefe, substanţele imunosupresoare, şi mai ales azatioprina, au efecte nocive directe (leziuni ale mucoasei intestinale înainte de a se fi declanşat răspunsul imunologic al gazdei) (415).

TRANSPLANTAREA ARTERELOR

Este un fapt deosebit de evident că în homografele de organe la om şi la animale de experienţă se produc precoce leziuni vasculare (116, 123, 218, 253, 410). Deoarece stratul endotelial al vaselor grefei este cel dintîi ţesut al donatorului care intră în contact cu sîngele circulant al gazdei, este rezonabilă presupunerea că acest contact determină natura şi severitatea reacţiei ulterioare a organismului faţă de întreaga homografă. Rezultatele imediate ale acestui contact asupra endoteliului vascular au fost studiate şi pe homografe vasculare clinice şi experimentale (32, 174, 198, 338, 390, 503, 512, 536) şi vor fi expuse pe larg în alt capitol.

Scanned with OKEN Scanner

Dimensiunile vaselor care irigă un organ sau un ţesut permit sau, dimpotrivă, nu permit să se execute anastomoze între vasele lor şi sistemul circulator al receptorului. Grefele de ţesuturi sau organe a căror irigaţie nu se restabileşte imediat după aplicarea lor, din lipsa acestor anastomoze, au fost numite grefe libere, independente. Astfel, grefele de piele, grefele ţesuturilor endocrine, grefele de cartilaj, grefele musculare sau grefele osoase se efectuează de obicei prin simplă implantare într-o anumită zonă a organismului gazdei, urmînd a fi vascularizate în timp, pe seama unei reţele de vase de neoformaţie.

Studiile iniţiale asupra imunologiei de transplantare s-au bazat pe asemenea grefe.

În experienţele de acest fel, evoluţia grefei se complică adesea cu necroza avasculară a părţii centrale a transplantului, similară aceleia care se produce în autotransplantul efectuat în aceeaşi condiţie.

Aceste homografe, ca şi organele homotransplantate care dispun de anastomozele vasculare corespunzătoare sînt supuse atacului imunologic al receptorului, dar consecinţele acestui atac sînt oarecum diferite de la o categorie de grefe la alta.

În cele ce urmează se prezintă particularităţile auto- şi homotransplantelor independente de ţesuturi. Dintre acestea a fost exclusă pielea, dat fiind că cercetarea a numeroase aspecte biologice ale transplantării făcîndu-se în experienţe de grefare a pielii, este obligatoriu să se rezerve capitole speciale.

TRANSPLANTAREA GLANDELOR ENDOCRINE

Dezvoltarea sintezei hormonilor şi succesele înregistrate în extragerea acelora care nu pot fi încă sintetizaţi fac ca folosirea homotransplantului de glande endocrine, în diversele insuficienţe hormonale, să aibă o indicaţie din ce în ce mai restrînsă. Totuşi, cercetările în acest domeniu continuă, folosindu-se variate subterfugii tehnice, în speranţa de a găsi în aceste intervenţii mijloace eficiente de modificare a răspunsului imunologic al gazdei şi de înlesnire a supravieţuirii unui alt transplant. Astfel, s-au întreprins studii asupra homotransplantelor de paratiroidă la cîine (540), de tiroidă la om (237) şi cîine (171, 413), de ovar la iepuri, maimuţe, şoareci şi şobolani (500), de corticosuprarenală la om (93, 249), de timus la animale (268, 383), de tiroidă canină la om şi de tiroidă umană la cobai (494) etc.

Poate că, în cazul hipofizei, transplantarea să aibă o utilizare clinică mai mare, dată fiind multitudinea hormonilor pe care ea îi secretă şi dificultatea de a-i sintetiza. Însă, ACTH se poate astăzi sintetiza, iar ceilalţi hormoni hipofizari vor putea fi sintetizaţi de asemenea în curînd. Din nefericire, este foarte greu de a transplanta hipofiza în contact cu hipotalamusul, şi acest fapt reduce mult capacitatea funcţională a transplantului (257).

Ţesuturile cu funcţii endocrine au un comportament cu totul particular după transplantare. Nu se cunosc condiţiile acestui comportament, deşi în acest domeniu s-au făcut investigaţii asidue. Numeroase lucrări în domeniul transplantării ţesuturilor endocrine şi al imunologiei de transplantare în acest caz au dus mai curînd la confuzie decît la elucidarea problemelor. Endo-

Scanned with OKEN Scanner

crinologii s-au angajat în generalizări asupra imunologiei de transplantare, pe baza datelor obținute cu aceste țesuturi, înainte de a fi luat cunoștință de problemele ridicate de reacția la homogrefă, declanșată de utilizarea tuturor celorlalte țesuturi. Dar, chiar dacă multe dintre lucrările mai vechi în acest domeniu sînt pasibile de o critică severă în privința unui control genetic corespunzător, ele furnizează totuși unele informații care completează eficace interpretarea altor date în legătură cu imunologia de transplantare. Faptul că țesuturile endocrine sînt tolerate după transplantare mai mult decît alte țesuturi subliniază în mod evident lipsa de uniformitate antigenică a diverselor țesuturi și, în consecință, necesitatea adaptării mijloacelor de inducere a imunotoleranței la fiecare țesut în parte. Aceste diferențe de antigenicitate între țesuturi sînt mai puțin marcante în cazul țesuturilor neendocrine. Un exemplu edificator este observația lui Billingham și Parkes (39), potrivit căreia grefele ovariene încrucișate la șobolani continuă adesea să secrete estrogeni, mult timp după ce grefele de piele între aceleași animale s-au rejectat. Rezultate similare acestora au obținut și alți autori (166). Kastin și Gittes (242) au hipofizectomizat șobolani Sprague-Dawley dintr-o colonie închisă, însă nu din aceeași linie genetică, și au transplantat simultan două hipofize în rinichiul acestora, după ce, în ziua precedentă, se realizase la aceste animale o grefă ortotopică de piele. Grefele de piele s-au eliminat după 3 săptămîni. Cu toate acestea, șobolanii cu grefe de hipofiză au continuat să crească mai bine decît animalele de control, deși mai puțin decît șobolanii normali. Grefele de hipofiză s-au vascularizat și nu au prezentat semnele vreunei reacții celulare. Chiar după rejecția grefelor de piele în grefele de hipofiză s-a observat o foarte slabă reacție limfocitară. Discrepanțe comparabile între timpul de supraviețuire a grefelor de piele și a grefelor de țesuturi endocrine au fost comunicate și de Russell și Gittes (441), care au studiat grefele paratiroidiene la șobolani, dar alți autori (235) nu au reușit să confirme din acest punct de vedere superioritatea grefelor suprarenaliene și paratiroidiene față de grefele de piele.

S-au propus numeroase explicații pentru aceste excepții ale comportamentului. O sugestie adoptată de mulți cercetători extinde concepția lui Halsted (după care o autografă endocrină se poate face cu succes numai dacă există o deficiență absolută în activitatea secretoare respectivă a gazdei) asupra homografelor endocrine. Alți autori (207) prezintă argumente în favoarea altor explicații: fie că o grefă endocrină realizează un stimul antigenic slab, care determină numai un răspuns imunologic parțial, fie că la țesuturile endocrine, seriile de antigene de histocompatibilitate cu determinare genetică sînt mai limitate decît la alte țesuturi. Se pare însă că o homografă ovariană poate fi la fel de efectivă ca și o homografă de piele în declanșarea procesului imunologic de transplantare, cel puțin în acele cazuri în care diferențele de histocompatibilitate sînt considerabile. Verificarea celei de-a doua explicații implică estimarea numărului de gene care controlează reacția de histocompatibilitate între animalele din două linii genetice diferite atît pentru țesutul endocrin, cît și pentru țesutul fără funcție endocrină. Lucrările efectuate în scopul elucidării acestei supoziții (39, 207, 241, 257, 274—276, 386—388, 453) nu au dat rezultate concludente. Dintre aceste lucrări sînt de menționat, în mod deosebit, acelea ale lui Parkes (386), care a demonstrat că pretratamentul

Scanned with OKEN Scanner

șobolanilor cu injecții intraperitoneale de homogenate de ovare mărește proporția de supraviețuire a homografelor ovariene între animale de linii genetice diferite, ceea ce nu se întîmplă dacă se face pretratament cu izografe ovariene, și că pretratamentul cu homografe de piele, care sînt eliminate și care, deci, ar trebui să imunizeze animalul, nu prelungește supraviețuirea homografelor ovariene ulterioare. Interesant ar fi de asemenea să se știe dacă o grefă de piele secundară este sau nu protejată de o grefă ovariană prealabilă, dar acest fapt nu a fost comunicat pînă în prezent. La fel sînt de menționat lucrările lui Cock (91), care a observat că, la păsări, transplantele de ovare efectuate la masculi castrați în prealabil supraviețuiesc o perioadă îndelungată, în care se dezvoltă și imunitatea față de hematiile donatorului.

Linder (276) susține că țesuturile endocrine conțin toate antigenele eliberate de grefele de piele și că supraviețuirea lor mai mare este condiționată de alți factori. De exemplu, pielea se transplantează aproape totdeauna ortotopic, situație în care revascularizarea se face probabil mai rapid, distrugerile ischemice fiind minime și transferul de antigene pe cale limfatică realizîndu-se mai repede, în timp ce grefele endocrine se fac de obicei în țesutul gras subcutanat, situație în care revascularizarea este mai puțin rapidă, consecințele ischemiei sînt mai grave, iar drenajul limfatic mai puțin complet. Sînt citate cazuri la șoarece în care, fragmente de piele în greutate egală cu fragmente de ovar, homotransplantate simultan în țesutul subcutanat al toracelui, supraviețuiesc o perioadă aproximativ egală (257), sau cazuri în care ovarele homotransplantate la șobolancă, șoricioaică sau femela de hamster atît subcutanat, cît și ortotopic, au perioade de supraviețuire diferite, explicabile prin faptul că în jurul grefelor subcutanate se constituie o capsulă de țesut conjunctiv avascular, pe cînd grefele ortotopice sînt bogat irigate (388). Pe de altă parte, în funcție de particularitățile metabolice ale țesutului transplantat, lipsa anumitor factori din dieta animalelor poate influența perioada de supraviețuire a unui anumit țesut. Deficiența de piridoxină în dieta șoarecilor influențează în mod evident supraviețuirea homografelor de ovar (387).

În cele ce urmează vor fi prezentate unele observații privind cîteva dintre țesuturile endocrine asupra transplantării cărora există o evidență mai amplă.

Pancreasul endocrin. Capacitatea pancreasului transplantat de a reduce nivelul glicemiei receptorului este o preocupare continuă, din 1927 pînă în prezent (53, 60, 111, 154, 211—213, 269, 288, 423, 424).

În anumite condiții, la cîine, homotransplantul pancreatic supraviețuiește de 3 ori mai mult decît homotransplantul renal, fără nici un tratament imunosupresor. Nu se știe în ce măsură relațiile funcționale ale acestei glande, ca și ale altor glande, cu prezența și starea funcțională a timusului, care are un rol important în formarea anticorpilor și determinarea răspunsului imunologic și a histocompatibilității (7, 229, 328—330, 502, 525), sînt responsabile de supraviețuirea ei mai lungă după transplantare. La hamsterii tineri timectomizați, homoimplantul pancreatic se dezvoltă mai mult decît la hamsterii tineri normali. Între evoluția homoimplantului pancreatic la hamsterii tineri timectomizați și hamsterii tineri tratați cu cortizon există o similitudine impresionantă (fig. 18, A, B, C).

Scanned with OKEN Scanner

șobolanilor cu injecții intraperitoneale de homogenate de ovare mărește proporția de supraviețuire a homografelor ovariene între animale de linii genetice diferite, ceea ce nu se întîmplă dacă se face pretratament cu izografe ovariene, și că pretratamentul cu homografe de piele, care sînt eliminate și care, deci, ar trebui să imunizeze animalul, nu prelungește supraviețuirea homografelor ovariene ulterioare. Interesant ar fi de asemenea să se știe dacă o grefă de piele secundară este sau nu protejată de o grefă ovariană prealabilă, dar acest fapt nu a fost comunicat pînă în prezent. La fel sînt de menționat lucrările lui Cock (91), care a observat că, la păsări, transplantele de ovare efectuate la masculi castrați în prealabil supraviețuiesc o perioadă îndelungată, în care se dezvoltă și imunitatea față de hematiile donatorului.

Linder (276) susține că țesuturile endocrine conțin toate antigenele eliberate de grefele de piele și că supraviețuirea lor mai mare este condiționată de alți factori. De exemplu, pielea se transplantează aproape totdeauna ortotopic, situație în care revascularizarea se face probabil mai rapid, distrugerile ischemice fiind minime și transferul de antigene pe cale limfatică realizîndu-se mai repede, în timp ce grefele endocrine se fac de obicei în țesutul gras subcutanat, situație în care revascularizarea este mai puțin rapidă, consecințele ischemiei sînt mai grave, iar drenajul limfatic mai puțin complet. Sînt citate cazuri la șoarece în care, fragmente de piele în greutate egală cu fragmente de ovar, homotransplantate simultan în țesutul subcutanat al toracelui, supraviețuiesc o perioadă aproximativ egală (257), sau cazuri în care ovarele homotransplantate la șobolancă, șoricioaică sau femela de hamster atît subcutanat, cît și ortotopic, au perioade de supraviețuire diferite, explicabile prin faptul că în jurul grefelor subcutanate se constituie o capsulă de țesut conjunctiv avascular, pe cînd grefele ortotopice sînt bogat irigate (388). Pe de altă parte, în funcție de particularitățile metabolice ale țesutului transplantat, lipsa anumitor factori din dieta animalelor poate influența perioada de supraviețuire a unui anumit țesut. Deficiența de piridoxină în dieta șoarecilor influențează în mod evident supraviețuirea homografelor de ovar (387).

În cele ce urmează vor fi prezentate unele observații privind cîteva dintre țesuturile endocrine asupra transplantării cărora există o evidență mai amplă.

Pancreasul endocrin. Capacitatea pancreasului transplantat de a reduce nivelul glicemiei receptorului este o preocupare continuă, din 1927 pînă în prezent (53, 60, 111, 154, 211—213, 269, 288, 423, 424).

În anumite condiții, la cîine, homotransplantul pancreatic supraviețuiește de 3 ori mai mult decît homotransplantul renal, fără nici un tratament imunosupresor. Nu se știe în ce măsură relațiile funcționale ale acestei glande, ca și ale altor glande, cu prezența și starea funcțională a timusului, care are un rol important în formarea anticorpilor și determinarea răspunsului imunologic și a histocompatibilității (7, 229, 328—330, 502, 525), sînt responsabile de supraviețuirea ei mai lungă după transplantare. La hamsterii tineri timectomizați, homoimplantul pancreatic se dezvoltă mai mult decît la hamsterii tineri normali. Între evoluția homoimplantului pancreatic la hamsterii tineri timectomizați și hamsterii tineri tratați cu cortizon există o similitudine impresionantă (fig. 18, A, B, C).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 18. — A, B

A — formațiuni insulare într-un homoimplant pancreatic la 24 de ore după operație (fuxină, × 100).

B — o formațiune din (*A*) observată cu un obiectiv mai mare (fuxină, × 500); a se observa că aspectul său este asemănător acelui al unei formațiuni insulare pancreatice normale (*C*). [după House și colab. (212)].

Scanned with OKEN Scanner

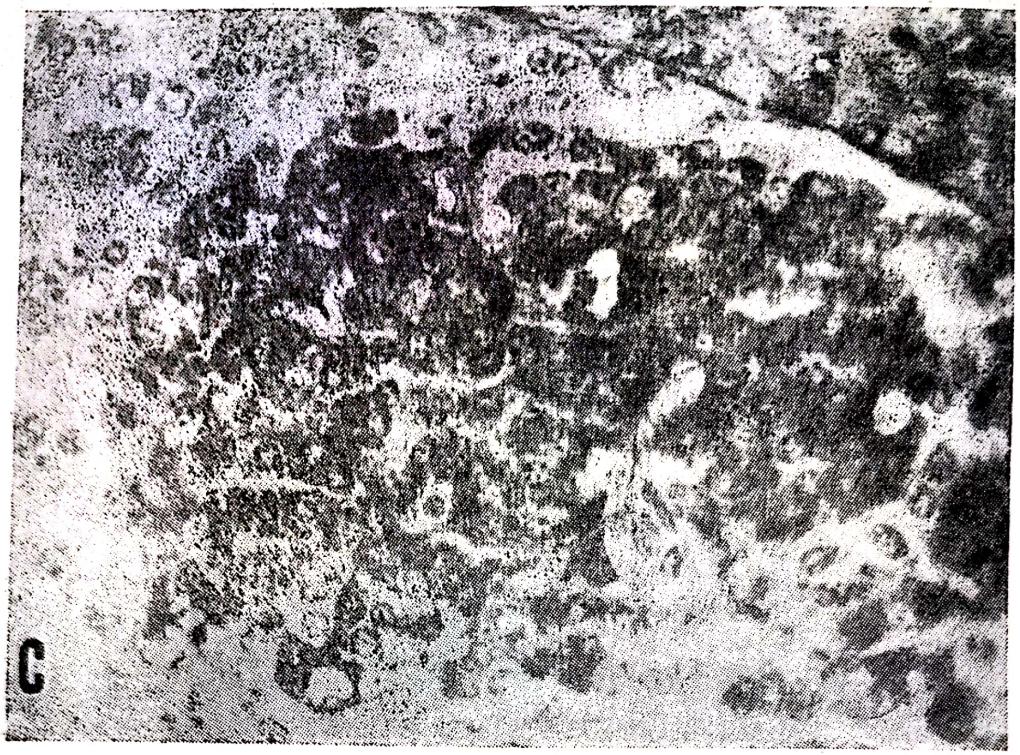


Fig. 18. C

S-au imaginat și diverse tehnici de transplantare ortotopică a pancreasului endocrin, în funcție de scopul urmărit (288, 423, 424). Ablația pancreasului receptor se face ca în figura 19 A, duodenul și vascularizația sa fiind păstrate. Izolarea segmentului pancreatic la donator se execută ca în figura 19 B: vasele splenice sînt secționate la nivelul cozii pancreasului, arterele gastro-epiploică stîngă, gastrică stîngă și hepatică, ca și venele gastro-epiploică stîngă, coronara stomacului și mezenterică superioară sînt ligaturate și secționate. Corpul pancreatic se divide la nivelul venei porte; partea sa distală și coada, împreună cu vascularizația proprie, artera celiacă și vena portă, se transplantează, aceste vase anastomozîndu-se, cu artera și respectiv vena femurală (fig. 19 C) sau cu artera și, respectiv, vena splenică, în acest din urmă caz, partea secționată a pancreasului inserîndu-se în stomac. Pentru a se reduce funcția exocrină a pancreasului care urmează a fi transplantat, Banting și Best (13) au preconizat ligatura canalului pancreatic cu 6—7 săptămîni înainte de transplantare.

Hiperglicemia consecutivă pancreatectomiei totale are o evoluție progresivă, care nu este influențată de implantarea subcutanată a țesutului pancreatic omolog, dacă nu se asigură irigația acestuia. În acest ultim caz, hiperglicemia pancreatoprivă a receptorului este coborîtă cu 40%, iar dacă înainte de transplantare cu 6—7 săptămîni s-a ligaturat canalul pancreatic al donatorului, în 80% din cazuri hiperglicemia pancreatoprivă a receptorului este adusă la valori normale.

Supraviețuirea maximă a homotransplantului pancreatic este de 14 zile, dacă nu se asigură drenajul extern al canalului pancreatic și de 25 de zile, dacă se asigură acest drenaj.

Glanda suprarenală. S-a încercat autotransplantarea suprarenalei pentru tratamentul unor boli endocrine, ca boala Cushing (147, 189, 195, 196, 223). S-a sperat că supraviețuirea unor asemenea transplante glandulare în coapsă ar conserva un anumit grad de activitate adrenocorticală, care ar putea reduce riscul unei pigmentări excesive a pielii datorită hormonului stimulant melanofor (MSH). Tehnica operatorie constă de obicei în anastomozarea venei centrale a suprarenalei la capătul distal al venei safene secționate. Inițial, glanda s-a plasat lîngă un mușchi, dar ulterior s-a constatat că supraviețuirea este favorizată de introducerea sa într-un spațiu creat prin dilacerarea mușchiului *sartorius* adiacent, după ce s-a efectuat anastomoza venoasă. S-au obținut rezultate satisfăcătoare și prin implantarea unor fragmente mici, multiple, de țesut suprarenal în mușchiul *sartorius*, după suprarenalectomie totală (147, 195, 223).

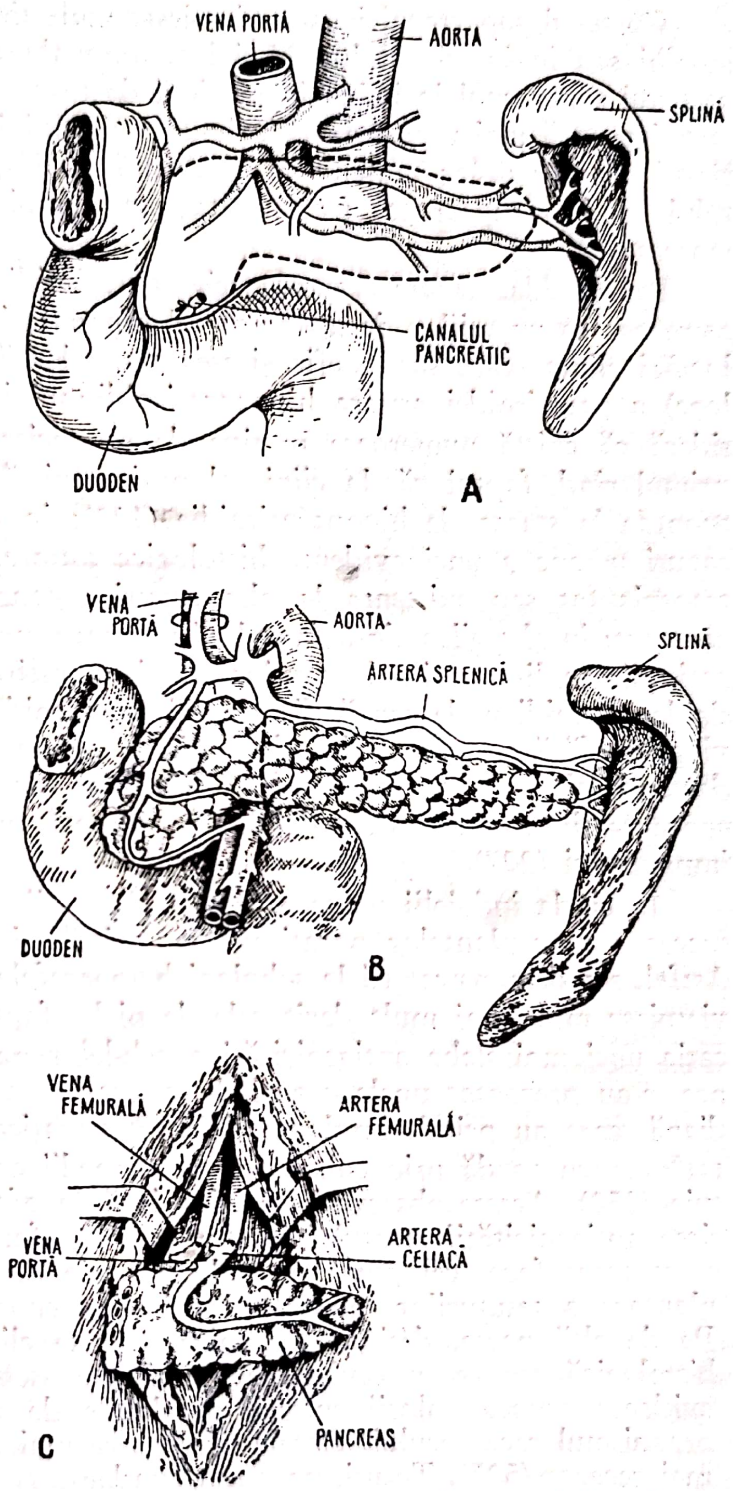


Fig. 19.

A — schema patului pancreatic (linia întreruptă) după pancreatectomie; vasele duodenului sînt păstrate; canalul pancreatic este ligaturat; *B* — schema prelevării corpului și cozii pancreasului la donator; artera celiacă și vena portă sînt izolate; linia întreruptă arată locul de secțiune a pancreasului, corpul și coada urmînd a fi folosite ca grefă; *C* — plasarea pancreasului la receptor; artera celiacă și vena portă a grefei sînt anastomozate la artera și, respectiv, vena femurală ale gazdei. Canalul pancreatic este ligatura [după Reemtsma și colab. (423)].

Scanned with OKEN Scanner

Cortexul suprarenalei supraviețuiește mult timp dacă este plasat lîngă un mușchi sau în interiorul lui. Medulosuprarenala este mult mai sensibilă decît cortexul suprarenal la ischemia produsă de transplantarea sa. Acesta din urmă se oxigenează mai ușor prin difuziunea oxigenului și prin pătrunderea în interiorul său a vaselor mușchiului înconjurător. Capacitatea funcțională a țesutului cortical suprarenal transplantat sau implantat este proporțională cu masa sa.

Paratiroida. Homotransplantele paratiroidiene au fost considerate de asemenea ca un mijloc de tratament al hipoparatiroidismului. Deși există unele lucrări clinice care susțin eficacitatea transplantării omologe (și chiar heterologe) a paratiroidei asupra hipoparatiroidismului, sînt autori (458) care consideră că există numeroase motive de scepticism în legătură cu aceasta: în primul rînd, faptul că, la cîini cel puțin, există posibilitatea de a se adapta spontan la starea de hipoparatiroidie (122); în al doilea rînd, lipsa la unele cazuri umane a unei evidențe histologice asupra stării țesutului paratiroidian transplantat sau existența la alte cazuri umane a unei evidențe histologice contrare; în al treilea rînd, faptul că un mare număr de cîini paratiroidectomizați, cărora li s-au implantat înainte de paratiroidectomie fie mușchi sterno-cleido-mastoidian de capră, fie glandă paratiroidă de la același animal, supraviețuiesc fără tratament de substituție cu calciu. Mulți dintre cîinii paratiroidectomizați, care au un implant heterolog de glandă paratiroidă, prezintă concentrații normale ale calciului în plasmă, persistente chiar după excizia implantului (227).

În ciuda îndoielii pe care aceste observații o atrag asupra afirmațiilor de succes a transplantelor paratiroidiene există și o evidență mai optimistă. Astfel, s-a demonstrat că la șobolani homografele de glandă paratiroidă supraviețuiesc mult mai mult decît cele de piele, fapt care ar putea avea semnificația unei mai slabe antigenicități a celulelor paratiroidiene (441). De asemenea, s-au prezentat unele cazuri de succes la oameni cu tetanie hipoparatiroidiană, care au primit implante de țesut paratiroidian uman neonatal, „adaptat" pentru gazdă prin cultivarea sa în medii conținînd serul sanguin al acestuia (250). Aceste observații nu sînt însă în afara oricărui comentariu. Folosirea antigenicității țesutului imatur este în afara postulatului, potrivit căruia acest țesut face, cel puțin parțial, excepție de la legile imunității de transplantare a țesuturilor, un postulat încă neconsolidat prin dovezi suficiente. Pe de altă parte, deși se comunică succese clinice, nu se prezintă evidență histologică asupra supraviețuirii grefei. De asemenea, este cel puțin echivocă evidența asupra valorii culturii prealabile de „adaptare" a homografelor la organismul receptorului. Datele prezentate mai sus sînt sprijinite și de lucrări mai recente (527). Totuși, pentru a fundamenta aceste observații, sînt necesare studii clinice suplimentare, mai ales asupra implantelor paratiroidiene fetale, cu atît mai mult, cu cît paratiroide normale, proaspete și sterile sînt mai ușor de procurat de la donatori fetali decît de la donatori adulți. Nu este exclus ca eficacitatea acestei metode să fie condiționată de amănunte tehnice, asupra cărora nu există informații suficiente. De exemplu, nu se știe încă în ce stadiu

Scanned with OKEN Scanner

al evoluției fetale, glanda paratiroidă devine funcțională. Există în literatură sugestii, bazate pe criterii exclusiv morfologice, asupra apariției funcției paratiroidiene la om în a doua jumătate a vieții fetale (538), dar, afară de lucrările lui Gaillard (150) și Scothorne (458), nu există o analiză experimentală directă a acestei probleme. Folosind observația clasică a lui Barnicot (24), verificată și de alți autori (82, 151), privind acțiunea hormonului paratiroidian asupra osului, Scothorne (458) a stabilit că la fetusul uman, funcția paratiroidiană apare la 12—13 săptămîni de gestație și că la fetusul de oaie, ea apare mult mai curînd. Ca atare, glandele paratiroide umane fetale pot fi folosite ca homografe active după acest moment al gestației. De altfel, ele sînt ceva mai puțin susceptibile de a genera și suferi reacția imunologică a gazdei decît cele provenind de la omul adult.

Ovarul. Autonomia funcțională a grefelor de ovare este un fapt semnalat de multă vreme în literatură. S-au folosit pentru studiul ovarului transplantat numeroase specii, dat fiind că majoritatea dintre ele prezintă dispoziții anatomice care fac puțin probabil succesul transplantării. Dintre aceste specii, șoarecele, la care ovarul are o membrană capsulară deosebită, s-a dovedit a fi cel mai potrivit animal pentru asemenea studii (434—436). Tehnica de transplantare ortotopică a ovarului a constituit subiectul a numeroase lucrări (442, 444, 491). O variantă mai nouă a acestei tehnici a fost propusă de Parrott și Parkes (389), care înlocuiesc ablația ovarelor gazdei cu sterilizarea ei prin iradiere cu raze Röntgen, urmată de introducerea grefei în bursa ovarului sterilizat. Tehnicile cele mai noi (232, 256), mai radicale din punct de vedere chirurgical decît cele mai vechi, par să ofere condiții mai satisfăcătoare de experimentare, dat fiind că înlătură o serie de deficiențe, ca adeziunea capsulară postoperatorie, ineficiența procesului de revascularizare a grefei sau pierderea unui număr excesiv de oocite prin ischemie.

Transplantul de ovar a fost folosit pentru studii de fiziologie a reproducerii, care au condus la observații foarte interesante. Astfel, s-a constatat că înlocuirea ovarelor îmbătrînite cu ovare tinere restaurează sau normalizează ciclurile estrale ale gazdei (care se împerechează din nou, produce un număr normal de ovule fertilizabile și implantabile în mucoasa uterină) și că transplantarea inversă a ovulelor fertilizate ale unei șoricioaice bătrîne în uterul uneia tinere, este urmată de dezvoltarea blastocitelor bătrîne, în mod asemănător dezvoltării blastocitelor tinere. Experiențele din primul tip reclamă o eliberare adecvată a gonadotrofinelor, cu condiția ca insuficiența ovariană să nu fie consecința unor modificări senile ale lobului anterior al hipofizei. Din aceste experiențe reiese, așadar, că modificările fertilității produse de vîrstă au implicații mai largi decît îmbătrînirea ovarului și că aceste modificări pot fi influențate pe diverse căi (254, 255, 257).

Experiențe concepute în același scop, de îndată ce s-a stabilit că există diferențe între ovarele animalelor aparținînd unor linii genetice diferite, au permis să se cunoască particularitățile de comportament al ovarelor animalelor de linie genetică pură, în condițiile grefării la hibrizi corespunzători. Primele experiențe de acest fel au fost efectuate de Bittner și Huseby (42), care au arătat că diferențele morfologice dintre ovarul de șoricioaică aparținînd liniei A și cel aparținînd unei femele din linia C3H dispar după 3 luni, dacă aceste ovare se transplantează subcutanat la un hibrid (C3H × A), și că ovarele femelelor din aceste linii genetice au o capacitate diferită de a induce cancer la gazda hibridă. Transplantarea ortotopică a ovarelor a furnizat date mai interesante. De exemplu, dacă se transplantează ortotopic un ovar de șori-

Scanned with OKEN Scanner

cioaică din linia CBA și unul de șoricioaică din linia A (animale care prezintă deosebiri de fertilitate și de lungime a perioadei de reproducție) la o șoricioaică hibridă (CBA×A), care este împerecheată după aceea cu un șoarece din linia A, urmașul procreat pe seama ovarului CBA va fi un hibrid (CBA×A) (prin urmare pestriț), în timp ce urmașul procreat pe seama ovarului A va fi un șoarece (A×A) (prin urmare alb) (233, 257).

Transplantarea ovarului a permis de asemenea efectuarea unor studii edificatoare asupra procesului de diferențiere sexuală. Aceste experiențe au fost inspirate de constatarea mai veche a lui Pfeiffer (401), potrivit căreia testiculele transplantate la șobolanii nou-născuți pot produce modificări profunde în dezvoltarea ulterioară a sexualității (activitatea ciclică a hipofizei, caracteristică femelelor, se transformă în activitate continuă, caracteristică masculilor; ciclurile estrale normale sînt înlocuite cu cornificarea constantă a vaginului, cu absența ovulației și a formării de *corpus luteum*), acest efect fiind explicat prin acțiunea androgenului eliberat din testiculul grefat asupra hipofizei (401) sau a „centrilor sexuali" din hipotalamus (202, 300). Cercetări recente au demonstrat că o singură administrare de hormon androgen în perioada postnatală precoce poate condiționa diferențierea sexuală (25), după cum grefele ovariene la șobolancă (în special în camera anterioară a ochiului, unde pot fi urmărite cu ușurință), combinate cu grefele vaginale (pe seama cărora se apreciază prezența sau absența secreției ciclice a hormonilor), condiționează diferențierea sexuală în sens invers (199). Efectul hormonilor androgeni asupra ovarului nu este direct, așa cum a reieșit din experiențe pe șobolan (199) și șoareci (257). Transplantarea ortotopică a ovarelor de la șoricioaice tratate este mai fertilă cînd se execută la gazde normale (257).

Hipofizectomia s-a dovedit că încetinește ritmul eliberării oocitelor de către ovar (234) și scade sensibilitatea ovarelor la gonadotrofine (257). Transplantarea ortotopică la gazde tinere a unor ovare „îmbătrînite" prin hipofizectomie a prilejuit observația interesantă că, în noul mediu, ele pot ovula și pot înlesni nașterea unor urmași normali (234).

Timusul. În reacția imunologică de transplantare, timusul pare a avea implicații mai complexe (condiționate de caracterul său limfoid) decît alte glande endocrine. Rolul său în imunologia de transplantare a făcut obiectul unor interesante lucrări de sinteză (331—333, 336, 383, 384); el va fi prezentat pe larg în alt capitol al acestei lucrări.

TRANSPLANTAREA ȚESUTURILOR HEMATOPOIETICE

În sensul strict al cuvîntului, potrivit opiniei lui Loutit (280), țesuturile hematopoietice nu sînt „transplantate", ci „însămînțate", dat fiind că celulele hematopoietice ale donatorului, unități funcționale bine determinate morfologic, se răspîndesc în organismul receptorului, unde se reproduc și suferă diviziuni de maturație (469). Cele mai multe dintre cercetările din acest sector particular au fost efectuate pe șoarece; informații mai puțin numeroase s-au obținut prin experiențele pe șobolani, iepuri, cobai, cîini și maimuțe și foarte puține date au rezultat din studii pe om.

Scanned with OKEN Scanner

Ţesuturile hematopoietice. Elementele figurate ale sîngelui circulant al mamiferelor nu sînt formate în exclusivitate într-un anumit ţesut şi nici într-un anumit organ. Hematiile, granulocitele şi trombocitele sînt furnizate la mamifere după naştere de către măduva osoasă roşie. La omul adult, măduva osoasă roşie este răspîndită doar în oasele trunchiului, dar se extinde şi în cele periferice la omul tînăr şi în diverse condiţii în care hematopoieza este suprasolicitată. La şoareci, această măduvă populează tot scheletul, iar la şoarecii tineri şi chiar la şoarecii adulţi din anumite rase, pulpa roşie a splinei este activă din punct de vedere hematopoietic. Formarea monocitelor din sînge este de asemenea pusă pe seama măduvei osoase, dar celulele fagocitare de acest tip pot avea o origine extramedulară diversă. Limfocitele sînt masate în ţesutul limfatic (ganglioni limfatici, vase limfatice sau aglomerări limfatice răspîndite în unele ţesuturi şi cunoscute sub numele de plăci Peyer în intestin, corpusculi Malpighi în splină etc.). În toate aceste aglomerări de limfocite există o activitate mitotică normală, o structură foliculară şi, în anumite circumstanţe, sînt prezenţi aşa-numiţii centri germinativi. Acest ţesut limfoid periferic este socotit atît ca loc de geneză, cît şi ca loc de depozit pentru limfocitele circulante (146, 327). Mai mult, plasmocitele, care sînt rareori întîlnite în circulaţie, sînt produse de ţesutul limfoid periferic.

Din punct de vedere morfologic, timusul reprezintă o altă aglomerare de limfocite. Spre deosebire de ţesutul limfoid periferic, timusul nu are foliculi caracteristici, corticala sa fiind infiltrată dens cu limfocite mari, medii şi mai ales mici, dar fiind cu totul lipsită de plasmocite, în timp ce medulara sa, cu o populaţie celulară mai redusă, pare a fi sursă de hormoni şi factori cu acţiune stimulantă asupra limfocitozei (320, 384). În ciuda activităţii sale mitotice, extrem de intensă chiar în condiţii normale, nu este admis în unanimitate că limfocitele timice sînt eliberate în circulaţie (280).

În măduva osoasă se află de asemenea limfocite şi, într-o măsură mai mică, plasmocite. Limfocitele nu sînt dispuse în foliculi. Experienţele de urmărire a acestor celule prin marcare cu timidină-^{3}H la şobolan (454), cobai (383) şi cîini (244) nu au dat rezultate concordante. Originea acestor celule, ca şi soarta lor sînt de fapt incerte, cu toate că unii autori susţin că ele sînt celule tulpină (102, 553).

La *foetus*, în hematopoieză sînt implicate alte ţesuturi. Hematiile iau naştere iniţial în insulele sanguine, iar ulterior, eritropoieza se concentrează în ficatul fetal. La şoarece, limfopoieza fetală este limitată la timus, care se dezvoltă în ultima săptămînă a vieţii intrauterine şi condiţionează dezvoltarea ulterioară a sistemului limfoid şi a mecanismelor imunităţii (334, 336). Din observaţii histologice s-a putut deduce că, la şoarece, ficatul fetal are o activitate granulopoietică limitată (280), fapt negat însă în cazul ficatului fetal uman (506). Cînd măduva osoasă începe a se dezvolta la şoarece, adică înainte cu 2—3 zile de naştere, granulopoieza este activitatea sa dominantă şi se menţine dominantă şi ulterior (506).

Relaţiile dintre ţesutul mieloid, timus şi ţesutul limfoid periferic. Aceste relaţii au fost elucidate în mod gradat. Ţesutul limfoid timic fetal, aparent de origine epitelială (8), exportă pe cale sanguină probabil limfoblaşti, care populează ţesuturile limfoide (337). Dacă se excizează complet timusul la şoarece imediat după naştere, ţesuturile limfatice nu se mai dezvoltă sau se dezvoltă insuficient, instalîndu-se astfel aplazia secundară a sistemului limfatic (30, 337). Acest efect a fost explicat prin intervenţia fie a unor factori celulari, fie a unor factori hormonali, fie a factorilor din ambele grupe (384). Implantarea timusului la şoareci tineri timectomizaţi duce la recolonizarea gazdei cu celule limfoide (200, 335). Mai mult, un şoarece cu timusul intact poate suporta grefarea mai multor timusuri (321). Un timus compatibil astfel grefat conţine, după puţine săptămîni, numai celule mitotice din tipul celulelor gazdei (322). Timusurile unor şoareci din aceeaşi linie genetică aflaţi în parabioză ajung să conţină foarte curînd populaţii celulare în echilibru, aparţinînd ambilor parteneri (201), sursa lor fiind probabil ţesutul mieloid al acestora.

Traficul celular între timus şi restul sistemului limfoid este dificil de demonstrat. Se poate însă afirma cu certitudine că, la mamiferele tinere, timusul reprezintă cea mai mare aglomerare de limfocite, cu indexul mitotic cel mai înalt (246). Numeroase celule, dacă nu chiar toate celulele, din aglomerarea timică degenerează *in situ*, realizînd o rezervă locală de baze purinice şi pirimidinice pentru reutilizare. Această observaţie explică de ce, după administrarea unei singure injecţii de timidină-^{3}H unui animal, celulele timice sînt mai puţin încărcate cu această substanţă decît limfocitele din ganglionii limfatici (94). Pe baza unor cercetări histologice, s-a afirmat că celulele timice corticale migrează în medulara timusului, pătrund apoi în capilarele medulare şi, de aici, se răspîndesc în întreg organismul (446); faptul a fost confirmat şi de experienţe cu trasori radioactivi care au permis să se urmărească celule originare din timus pînă în pulpa roşie a splinei (137). Se pare că timusul nu exportă decît o parte din populaţia sa

Scanned with OKEN Scanner

celulară. Într-adevăr, la animalul matur, timectomia se asociază cu limfopenie în sîngele circulant şi cu oarecare depopulare celulară a ţesuturilor limfoide, fără a fi însă afectat numărul de celule limfoide din măduva osoasă (34). Acestea din urmă se marchează cu timidină-^{3}H cu mai multă uşurinţă decît limfocitele timice, din moment ce ele conţin în proporţie de 100% substanţa, la cîteva zile după injectarea sa repetată intravenos (454), ceea ce înseamnă că, dacă sînt într-adevăr limfocite, fac parte dintr-o tulpină specială şi ar putea fi socotite ca potenţiale celule hematopoietice de origine (553). Recent, Cudkowicz şi colab. (102), folosind atît date personale, cît şi ale altor autori (22), privitoare la transferuri în serie ale măduvei osoase de la un receptor iradiat cu doze letale la altul, au observat un declin în capacitatea de colonizare a acestor celule, asociat cu scăderea corespunzătoare a numărului de limfocite. Totuşi, ca şi în cazul sîngelui periferic, care conţine un număr — foarte redus — de celule capabile să recolonizeze un animal iradiat cu doze letale de radiaţii (406), raportul unităţi formatoare de colonii/limfocite (511) este foarte mic. Astfel, numai un număr limitat de celule limfoide din măduva osoasă sînt celule de origine sau se află în starea în care ar putea să manifeste o asemenea activitate.

Evidenţa din ce în ce mai bogată asupra capacităţii celulelor obţinute din timusul animalelor presensibilizate de a se angaja într-o serie de răspunsuri secundare specifice (140, 264, 478, 495) ridică problema dacă timocitele native sînt ele însele capabile să participe la răspunsul imun sau dacă celulele competente imunologic pot pătrunde în timus. Cunoştinţele actuale asupra naturii celulelor sensibilizate din timus sînt oarecum contradictorii. Celulele obţinute din timus nu sînt, în general, în stare să întreprindă o reacţie imună primară şi deşi anumite antigene administrate parenteral pot pătrunde în timusul intact (89, 447), nu se produc modificări histologice sugestive pentru un răspuns imun (152). Dimpotrivă, introducerea antigenului direct în parenchimul timic este urmată de un răspuns morfologic imun caracteristic (44, 301, 463).

Splina şi sîngele posedă celule care pot pătrunde şi prolifera în timusul intact al şoarecilor (153, 201) şi, într-adevăr, o împrospătare hematogenă constantă a celulelor timice ar putea fi vitală pentru economia normală a acestui organ (201, 322). Dar, în prezent, nu există date concordante asupra implicaţiilor timusului în recircularea limfocitelor periferice şi, mai ales, asupra capacităţii limfocitelor marcate transfuzate şi a timocitelor de a pătrunde în timus (94, 136, 152, 179, 342, 366). Cu toate acestea, posibilitatea ca celule competente imunologic să poată pătrunde în timus pare a fi o realitate. S-a sugerat, de exemplu, că plasmocitele care se găsesc în timusul şobolanului adult normal reprezintă o migraţie plasmocitară în acest organ, originea lor aflîndu-se în altă parte (448). Prezenţa limfocitelor peripatetice sensibilizate în timus contribuie la capacitatea timocitelor şoarecilor presensibilizaţi de a se angaja în procesele imunologice secundare specifice (140, 264, 478, 495). Limfocitele se află în dezavantaj faţă de celulele măduvei osoase în repopularea timusului la şoarecele iradiat cu doze letale (146). Nu numai celulele sanguine (201), ale splinei (153) sau ocazional acelea ale canalului toracic (172) pot pătrunde în timusul de şobolan sau şoarece adult, ci şi celule de surse externe (201, 322), dar în acest caz trebuie avut în vedere obstacolul pe care-l constituie arhitectura vasculară specializată a timusului (88, 533) la pătrunderea celulelor în parenchimul său.

Am considerat necesară prezentarea acestor date nu numai pentru înţelegerea problemelor privind grefele de ţesut hematopoietic, ci şi pentru implicaţiile pe care acest ţesut le are în imunitatea de transplantare, care face subiectul altui capitol.

Modalităţile şi condiţiile transplantării ţesutului hematopoietic. Toate ţesuturile angajate în activitatea mitotică intensă care susţine eliberarea facilă a celulelor din stocurile consumabile în sîngele circulant au o sensibilitate foarte mare faţă de radiaţiile ionizante şi agenţii chimici antimitotici. În aceste condiţii, moartea celulară se produce prin alterarea fazelor postmitotice. Limfocitele sînt distruse cu uşurinţă de către radiaţiile ionizante în cursul interfazei (517), fapt datorit interceptării aportului energetic, care, în cazul unei citoplasme sărace, este asigurat mai ales de fosforilarea oxidativă din nucleu (100). Într-adevăr, moartea prin expunere la radiaţii ionizante se datoreşte în primul rînd aplaziei sistemelor hematopoietice menţionate mai sus, bineînţeles dacă dozele nu sînt atît de mari încît să provoace moartea rapidă prin insuficienţa altor sisteme. Astfel, s-a dovedit că, dacă splina unui şoarece este

protejată cu o placă de plumb, în cursul iradierii totale chiar cu doze letale de raze Röntgen, animalul supraviețuiește; de asemenea, fără ca splina să fie protejată contra radiațiilor, dacă, după iradiere, se implantează intraperitoneal splină de la șoarece normal se obține un efect similar (91). De aici și pînă la încercarea de a suprima efectele iradierii letale a șoarecelui prin administrarea intravenoasă a unei suspensii de măduvă osoasă (278) n-a fost decît un pas. Aceste efecte favorabile au fost atribuite stimulării celulelor de origine, puține la număr, rămase nedistruse după iradierea gazdei, dar nu s-a exclus posibilitatea colonizării acesteia prin înmulțirea celulelor de origine, furnizate de implantul splenic sau prin inocularea intravenoasă a suspensiei de măduvă osoasă (280). Împotriva acestei ultime presupuneri s-a argumentat că, deoarece donatorul și receptorul nu au fost animale singenice, nu este posibil, din punct de vedere principial, ca celulele străine să colonizeze organismul gazdei fără a suferi efectele răspunsului său imunologic. Însă, experiențe în care în mod deliberat s-au exagerat diferențele antigenice dintre donator și receptor (șoareci iradiați au fost injectați cu suspensii de celule hematopoietice de cobai) sau experiențe în care s-au folosit celule-trasoare au demonstrat că nu poate fi exclusă colonizarea organismului receptorului (145, 280, 343). În urma iradierii masive, bariera imunologică, care împiedică în mod normal acceptarea celulelor străine, cedează și acestea se pot grefa. În cercetările cu celule-trasoare s-au folosit următoarele mijloace de marcare: antigenele de grup sanguin la șoarece (277), antigenele de histocompatibilitate (343), diferențele histochimice privind fosfataza alcalină în granulocitele de șoarece și șobolan (380, 522), unele formațiuni infracelulare ale granulocitelor de iepure (408) sau cîine (507), diferențele dintre hemoglobine (407, 534), sau diferențele de cariotip între șoarece și șobolan sau între șoarecii normali și acei cu cromozomi vizibil anormali (79, 145, 440).

Două observații în legătură cu acceptarea grefelor de țesut hematopoietic merită a fi menționate, în mod deosebit:

a) Sîngele circulant este mediul în care se transportă celulele de origine. Acest fapt face aplicabilă injectarea intravenoasă a unei suspensii care conține astfel de celule sau chiar implantarea intraperitoneală a unei spline (91, 278, 279) și justifică protejarea splinei sau a unei părți de măduvă osoasă, atunci cînd iradierea organismului nu poate fi evitată. Asemenea metastaze de celule normale arată că metastazarea nu este un fenomen caracteristic pentru celulele tumorilor maligne.

b) În consecință, aceste celule libere, excluzînd cazurile de singenicitate, sînt expuse acțiunii unor anticorpi umorali, prezenți în plasmă. În această formă de grefare, o colonizare, chiar temporară, a receptorului cu celule alogenice poate fi împiedicată nu numai prin imunizarea sa activă cu antigene ale donatorului (19), ci și prin transferul pasiv al unor urme de ser imun (170, 281).

Indicațiile clinice ale transplantării țesutului hematopoietic. Aceste indicații sînt limitate la un număr de circumstanțe patologice sau accidentale: anemia aplastică, depresiunea sistemului limforeticular, leucemia și iradierea terapeutică sau accidentală.

Anemia aplastică umană a putut fi tratată prin transplantarea de măduvă osoasă între gemeni (341, 437, 508), dar nu și între donatori și receptori neînrudiți (459).

Depresiunea sistemului limforeticular a fost tratată cu succes temporar prin transplantare de măduvă osoasă. Astfel, cazuri de boală Hodgkin și-au îmbunătățit condiția hematologică pe

Scanned with OKEN Scanner

o durată de peste 2 ani după transplantare de măduvă osoasă (31, 492) sau celule hepatice fetale (57).

Succese ocazionale au fost comunicate cu privire la tratamentul unor cazuri de leucemie murină, prin iradierea totală a organismului, urmată de restaurarea tabloului hematologic cu ajutorul administrării de măduvă osoasă singenică (15, 514). Reacţia grefă-contra-gazdă, asupra căreia se va reveni în alt capitol, poate acţiona ca un element de atac asupra ţesutului leucemic, dar ea însăşi poate fi fatală (20). În ciuda acestor obstacole, Mathé şi colab. (302, 304) au continuat cercetările experimentale pe şoarece şi au aplicat unele observaţii la om. Ei au descris la om reacţia grefă-contra-gazdă după transplantarea ţesutului hematopoietic, arătînd că tabloul clinic în acest caz este asemănător aceluia descris la maimuţă (418, 523) — au prezentat cazuri de remisiune temporară a leucemiei după radioterapie şi transplantare de măduvă osoasă şi au stabilit unele condiţii care fac un asemenea tratament eficace (alegerea bolnavilor care să nu fi primit înainte transfuzii sanguine şi, deci, care să nu fie sensibilizaţi la izoantigene şi folosirea unui lot de donatori înrudiţi care să permită selecţionarea *in vivo* a liniilor celulare cele mai compatibile) (303).

Reimplantarea măduvei osoase autogene stocate a fost practicată de numeroşi autori (260, 399, 479), după iradierea cu doze letale a bolnavilor cu tumori maligne sau după perfuzie regională cu citostatice. Transplantarea de ţesut mieloid a fost încercată de asemenea cu rezultate bune în iradieri accidentale; dintre cei cinci fizicieni jugoslavi iradiaţi cu doze mortale, în cursul accidentului petrecut în 1959 la reactorul atomic de la Vinca, patru au beneficiat de pe urma unui astfel de tratament (304). Asupra acestui fapt se discută încă şi în prezent. Nu se ştie cît se poate atribui în aceste cazuri tratamentului şi cît recuperării spontane. Dat fiind însă că în sîngele circulant al acestor bolnavi hematiile de tipul donatorilor au crescut în mod evident, timp de cîteva săptămîni, înseamnă că homografa de ţesut hematopoietic a funcţionat (280).

Dezavantajele transplantării ţesutului hematopoietic. Dezavantajul major al transplantării ţesutului hematopoietic constă în declanşarea unei reacţii grefă-contra-gazdă cu aplazia ţesutului limfoid.

Reacţia grefă-contra-gazdă nu se produce, dacă pentru repopularea receptorului cu celule hematopoietice se foloseşte un donator singenic (23), dar apare frecvent în cazul în care donatorul nu face parte din aceeaşi linie genetică sau este xenogenic (19, 471, 518). În tentativele de a preveni această complicaţie imunologică s-a substituit măduva osoasă a adultului cu ţesut hematopoietic fetal din ficat sau splină, obţinîndu-se o oarecare prelungire a supravieţuirii celulelor transplantate (17, 267, 519), dar în legătură cu acest fapt există şi date discordante (101, 515).

Observaţii recente arată că chiar ficatul fetal singenic poate induce la şoarece apariţia unui sindrom, asemănător clinic, hematologic şi histologic cu reacţia grefă-contra-gazdă provocată de utilizarea măduvei osoase, care s-a prelevat de la animalul adult (21, 22). Moartea acestor animale se produce prin aplazia ţesutului şi amiloidoză (54), a căror evoluţie poate fi prevenită sau abrogată, dacă la suspensia mieloidă se adaugă celule din ganglionii limfatici ai unui animal singenic sau se administrează asemenea celule imediat după transplantarea măduvei osoase. Acest fapt arată fie că suspensia mieloidă este deficitară în celule limfopoietice precursoare, fie că limfocitele administrate au o influenţă protectoare sau trofică pînă cînd se restabileşte limfopoieza.

GREFELE DE CORNEE

Numai în ultima vreme oftalmologii care au practicat grefele de cornee s-au preocupat de problemele biologice ale acestora. Mai mult de un secol, interesul lor s-a concentrat asupra îmbunătăţirii tehnicii chirurgicale, celelalte

Scanned with OKEN Scanner

o durată de peste 2 ani după transplantare de măduvă osoasă (31, 492) sau celule hepatice fetale (57).

Succese ocazionale au fost comunicate cu privire la tratamentul unor cazuri de leucemie murină, prin iradierea totală a organismului, urmată de restaurarea tabloului hematologic cu ajutorul administrării de măduvă osoasă singenică (15, 514). Reacţia grefă-contra-gazdă, asupra căreia se va reveni în alt capitol, poate acţiona ca un element de atac asupra ţesutului leucemic, dar ea însăşi poate fi fatală (20). În ciuda acestor obstacole, Mathé şi colab. (302, 304) au continuat cercetările experimentale pe şoarece şi au aplicat unele observaţii la om. Ei au descris la om reacţia grefă-contra-gazdă după transplantarea ţesutului hematopoietic, arătînd că tabloul clinic în acest caz este asemănător aceluia descris la maimuţă (418, 523) — au prezentat cazuri de remisiune temporară a leucemiei după radioterapie şi transplantare de măduvă osoasă şi au stabilit unele condiţii care fac un asemenea tratament eficace (alegerea bolnavilor care să nu fi primit înainte transfuzii sanguine şi, deci, care să nu fie sensibilizaţi la izoantigene şi folosirea unui lot de donatori înrudiţi care să permită selecţionarea *in vivo* a liniilor celulare cele mai compatibile) (303).

Reimplantarea măduvei osoase autogene stocate a fost practicată de numeroşi autori (260, 399, 479), după iradierea cu doze letale a bolnavilor cu tumori maligne sau după perfuzie regională cu citostatice. Transplantarea de ţesut mieloid a fost încercată de asemenea cu rezultate bune în iradieri accidentale; dintre cei cinci fizicieni jugoslavi iradiaţi cu doze mortale, în cursul accidentului petrecut în 1959 la reactorul atomic de la Vinca, patru au beneficiat de pe urma unui astfel de tratament (304). Asupra acestui fapt se discută încă şi în prezent. Nu se ştie cît se poate atribui în aceste cazuri tratamentului şi cît recuperării spontane. Dat fiind însă că în sîngele circulant al acestor bolnavi hematiile de tipul donatorilor au crescut în mod evident, timp de cîteva săptămîni, înseamnă că homografa de ţesut hematopoietic a funcţionat (280).

Dezavantajele transplantării ţesutului hematopoietic. Dezavantajul major al transplantării ţesutului hematopoietic constă în declanşarea unei reacţii grefă-contra-gazdă cu aplazia ţesutului limfoid.

Reacţia grefă-contra-gazdă nu se produce, dacă pentru repopularea receptorului cu celule hematopoietice se foloseşte un donator singenic (23), dar apare frecvent în cazul în care donatorul nu face parte din aceeaşi linie genetică sau este xenogenic (19, 471, 518). În tentativele de a preveni această complicaţie imunologică s-a substituit măduva osoasă a adultului cu ţesut hematopoietic fetal din ficat sau splină, obţinîndu-se o oarecare prelungire a supravieţuirii celulelor transplantate (17, 267, 519), dar în legătură cu acest fapt există şi date discordante (101, 515).

Observaţii recente arată că chiar ficatul fetal singenic poate induce la şoarece apariţia unui sindrom, asemănător clinic, hematologic şi histologic cu reacţia grefă-contra-gazdă provocată de utilizarea măduvei osoase, care s-a prelevat de la animalul adult (21, 22). Moartea acestor animale se produce prin aplazia ţesutului şi amiloidoză (54), a căror evoluţie poate fi prevenită sau abrogată, dacă la suspensia mieloidă se adaugă celule din ganglionii limfatici ai unui animal singenic sau se administrează asemenea celule imediat după transplantarea măduvei osoase. Acest fapt arată fie că suspensia mieloidă este deficitară în celule limfopoietice precursoare, fie că limfocitele administrate au o influenţă protectoare sau trofică pînă cînd se restabileşte limfopoieza.

GREFELE DE CORNEE

Numai în ultima vreme oftalmologii care au practicat grefele de cornee s-au preocupat de problemele biologice ale acestora. Mai mult de un secol, interesul lor s-a concentrat asupra îmbunătăţirii tehnicii chirurgicale, celelalte

Scanned with OKEN Scanner

considerații asupra acestor grefe fiind lăsate pe locul al doilea. Ceea ce a favorizat o asemenea atitudine este pe de o parte faptul că țesutul corneean este un țesut avascular, pe de altă parte faptul că grefa de cornee se plasează într-un loc relativ izolat față de celulele circulante ale gazdei, ceea ce reduce incidența declanșării răspunsului imunologic al acesteia și permite grefarea țesutului cu succes. Celularitatea scăzută a țesutului corneean explică de asemenea potențialul său antigenic redus.

O grefă corneeană efectuată cu succes este aceea care restabilește vederea și rămîne în mod permanent perfect clară. Urmărirea atentă a homografei de cornee, timp de 2 săptămîni, este semnificativă pentru evoluția ei ulterioară, dat fiind că grefa care la sfîrșitul acestei perioade este transparentă poate fi considerată în afara riscului de rejecție (308). Factorii care controlează un astfel de succes sînt, pe lîngă tehnica chirurgicală adecvată, asepsia, preselecționarea cazurilor și restaurarea activității biologice normale a acestui țesut. Modificările biologice care duc la compromiterea grefei includ vascularizarea, edematierea și fibrozarea (445).

Asupra acestor procese anormale în evoluția unei grefe de cornee se va reveni în alt capitol. Aici menționăm numai cîteva observații privind supraviețuirea acestor grefe și controlul clinic al evoluției lor.

Se știe că epiteliul grefei de cornee se regenerează foarte rapid pe seama celulelor epiteliale ale gazdei, chiar cînd este înlăturat complet. Astfel, epiteliul unei grefe de cornee de 6 mm se reface într-o săptămînă după operație. Castroviejo (80) înlătură endoteliul corneei în cursul operației, considerîndu-l ca o sursă potențială de infecție sau ca o sursă de antigene dăunătoare corneei receptorului. Membrana Bowman nu se regenerează.

Soarta celulelor stromei corneene a fost studiată prin procedee diverse. Dohlman (119) a făcut o serie de experiențe pe iepuri, folosind ca indicator capacitatea acestor celule din corneea receptorului și a grefei de a încorpora sulfatul-^{35}S și a constatat că acest izotop este captat într-o măsură mai redusă timp îndelungat (peste 10 zile) după operație, situație similară cu aceea observată în corneea gazdei. S-a tras concluzia din aceste experiențe că imediat după keratoplastie se produce o pierdere de mucopolizaharide și, implicit, de proteine; această concluzie sprijină teoria conform căreia substanțele de structură ale grefei sînt eliminate total curînd după keratoplastie (90, 118, 308) și o altă teorie, după care moartea celulelor din stroma grefei nu se produce imediat după keratoplastie (155). Există o abundentă captare de sulfat-^{35}S la marginile plăgii corneene, unde ulterior acumularea progresivă a izotopului se face concomitent cu infiltrarea fibroblaștilor. După 34 de zile de la operație, grefa se vindecă, fibroblaștii dispar, iar captarea de sulfat-^{35}S devine normală chiar și în cicatrice.

Hanna și Irwin (187) au întreprins o serie de experiențe asupra grefei de cornee, folosind ca indicator capacitatea celulelor epiteliale și ale stromei, aflate în mitoză, de a încorpora timidina-^{3}H în ADN nuclear. În aceste experiențe, efectuate pe iepuri, corneea a fost lezată, iar după 24 de ore s-a introdus în camera anterioară a ochiului timidina-^{3}H, care a marcat nucleii elementelor celulare. Corneea astfel marcată a servit ca grefă pentru alt iepure de linie genetică diferită și a fost prelevată la perioade variate de timp pentru

Scanned with OKEN Scanner

a fi examinată. Autoradiografia unor asemenea grefe de cornee a arătat că celulele stromei şi celulele endoteliale ale homografei persistă peste 13 luni în ochiul receptorului. Cu ajutorul aceleiaşi metode, alţi autori (404) au arătat că supravieţuirea celulelor endoteliale ale homografei este de 1 an, iar supravieţuirea celulelor stromei sale de 2 ani.

Din cele de mai sus reiese, că, deşi epiteliul grefei corneene este reînnoit rapid de către gazdă, stroma de colagen a grefei şi un număr considerabil de celule care o populează supravieţuiesc peste 1 an. Folosind cromozomii specifici sexului ca mijloc de marcare biologică a celulei, Basu şi colab. (29, 30) au studiat, pe pisici şi şoarece, evoluţia constituenţilor celulari ai heterografelor intralamelare de cornee şi au constatat că, dacă asemenea grefe rămîn clare, în ele se află numai celulele originale ale donatorului, iar cînd devin opace, epiteliul lor este înlocuit în întregime cu celulele gazdei. Această observaţie sugerează că, în absenţa unei reacţii imunologice, celulele originale ale donatorului pot supravieţui indefinit în grefa de cornee. S-a presupus că dacă celulele heterografelor clare de cornee supravieţuiesc 2 luni (30), celulele homografelor pot supravieţui o perioadă mai mare de timp, această presupunere fiind atestată de constatarea că celulele originale ale donatorului supravieţuiesc în homografa de cornee umană peste 400 de zile (445).

Aşadar, în cazul homo- sau heterografei de cornee, reacţia imunologică este mult mai puţin violentă decît în cazul transplantării altor ţesuturi. Reacţiile la homografa de cornee se produc la om uneori chiar în absenţa vascularizării sau în prezenţa unei vascularizaţii reduse (90). Aceasta reiese din însuşi faptul că autokeratoplastiile în boli grave ale ochilor sînt deseori executate cu succes (26, 27, 120, 306). La iepuri, la care corneea este vascularizată, homografele de cornee se opacifiază şi sînt invadate de vase de neoformaţie, în timp ce autografele rămîn transparente (368). Frecvenţa opacifierii corneei grefate este proporţională cu gradul de vascularizaţie a ţesutului (39, 251, 305, 307).

Tendinţa spre evoluţie anormală a grefelor de cornee poate fi controlată terapeutic. De exemplu, vascularizarea excesivă a grefei în stadiul postoperator iniţial poate fi prevenită sau oprită prin folosirea steroizilor, aplicaţi fie local, fie pe cale subconjunctivală. Neovascularizaţia persistentă a grefei de cornee a fost supusă uneori radiaţiilor β ale unei surse de ^{90}Sr. Edemul grefei de cornee este, totuşi, o situaţie mai greu de controlat, implicînd leziuni permeabilizante preexistente ale endoteliului grefei. El nu poate fi controlat decît temporar, folosindu-se concentraţii mari de glicerol în aplicaţii locale sau inhibitori ai anhidrazei carbonice, care reduc formarea umorii apoase. Edemul persistent într-o grefă de cornee constituie de obicei o indicaţie pentru regrefare.

Apariţia fibrozei într-o asemenea grefă este un semn de prognostic defavorabil, care reclamă de asemenea regrefarea corneei.

Studii viitoare asupra modificărilor biologice din grefa de cornee sînt absolut necesare. La om, reacţiile imunologice de transplantare se situează pe planul întîi şi asupra lor cunoştinţele noastre sînt încă destul de limitate. Influenţa lizozimelor asupra biologiei grefelor de cornee ar trebui luată în consideraţie, pentru eventualele soluţii practice mai eficace de conservare de lungă durată a acestor grefe sau chiar a altor ţesuturi. Pe de altă parte, sim-

Scanned with OKEN Scanner

plitatea structurii antigenice a acestui țesut permite studii imunologice ale căror rezultate pot fi mai ușor descifrate, nefiind condiționate de intervenția unor factori multipli, complecși, ca în cazul altor țesuturi.

TRANSPLANTAREA MUȘCHIULUI STRIAT

Acest țesut se alătură celor care nu suportă transplantarea fără a i se asigura aportul sanguin, datorită marei sale sensibilități la lipsa de oxigen. Lipsit de aport sanguin, țesutul muscular se alterează ireversibil, în cîteva ore, și este înlocuit de țesut conjunctiv (324, 395). Literatura actuală asupra acestei probleme cuprinde observații realizate în cea mai mare parte pe piese musculare de dimensiuni foarte mici, independente, transplantate la animale (86, 87) și mai puțin pe fragmente musculare mari, independente (497, 555).

Dacă un mușchi (*biceps brachii* la păsări, *gastrocnemius* la mamifere) este prelevat în întregime și este fărămițat pînă la starea unei mase semilichide, autotransplantarea sa în această stare poate fi urmată de supraviețuire, dacă masa musculară astfel preparată se așază într-un strat subțire în jurul pachetului neuromuscular al mușchiului prelevat; acest țesut fărămițat suferă o profundă reconstrucție, după modelul mușchiului prelevat, constînd din formarea unor fibre musculare striate tipice, care răspund prin contracție la excitarea nervului corespunzător (497). Dacă o asemenea masă musculară se plasează pe o zonă în care țesutul muscular prezintă o leziune traumatică sau de altă natură, ea exercită o acțiune stimulantă asupra proceselor regenerative în mușchiul lezat, ca și în alte țesuturi. De aceea, această acțiune a fost folosită și în împrejurări clinice, ca în osteomielită, cu rezultate favorabile; țesutul muscular secționat în fragmente mici și autografat în cavitatea osteomielitică, după înlăturarea țesutului osos necrozat, supraviețuiește și se transformă într-un țesut muscular puțin diferențiat, cu acțiune stimulatoare asupra țesutului osos din jur (414, 449). Între procesele plastice ale mușchiului autotransplantat în această stare și ale mușchiului care a suferit o acțiune traumatizantă (denervare, tenotomie etc.) există o mare asemănare. Morfologic, această asemănare se exprimă prin variate semne de regenerare: creșterea și diviziunea nucleolilor, diviziunea amitotică a nucleilor, creșterea masei sarcoplasmei cu acumularea corespunzătoare a nucleilor, formarea de miofibrile și, în cazul traumatismelor mecanice, dezvoltarea mioblaștilor cu multiplicarea lor prin diviziune mitotică. Histochimic se constată în ambele cazuri acumularea de ARN în nucleolii și citoplasma mioblaștilor și a fibrelor musculare. Este interesant de semnalat că o creștere relativă a conținutului în ARN se produce și în mușchiul denervat și că, potrivit acestor observații, ea ar corespunde dezvoltării proceselor reconstructive, paralel cu procesele degenerative, distructive (430, 555). În 3 săptămîni, la șobolan, structura și funcția mușchiului autotransplantat în aceste condiții se refac; la alte mamifere, refacerea are loc într-o perioadă ceva mai mare. De asemenea, este interesant de semnalat că, la șobolan, mușchiul denervat cu 30—40 de zile înainte de autotransplantare, deci mușchiul cu atrofie de denervare, își recapătă în 2—6 luni de la transplantare volumul, greutatea și funcția dinainte de denervare (52, 498). Este necesar să se sublinieze că acest proces nu se limitează numai la o simplă creștere, ci cuprinde complicate procese de reorganizare a tuturor structurilor. Porțiunea centrală a autotransplan-

Scanned with OKEN Scanner

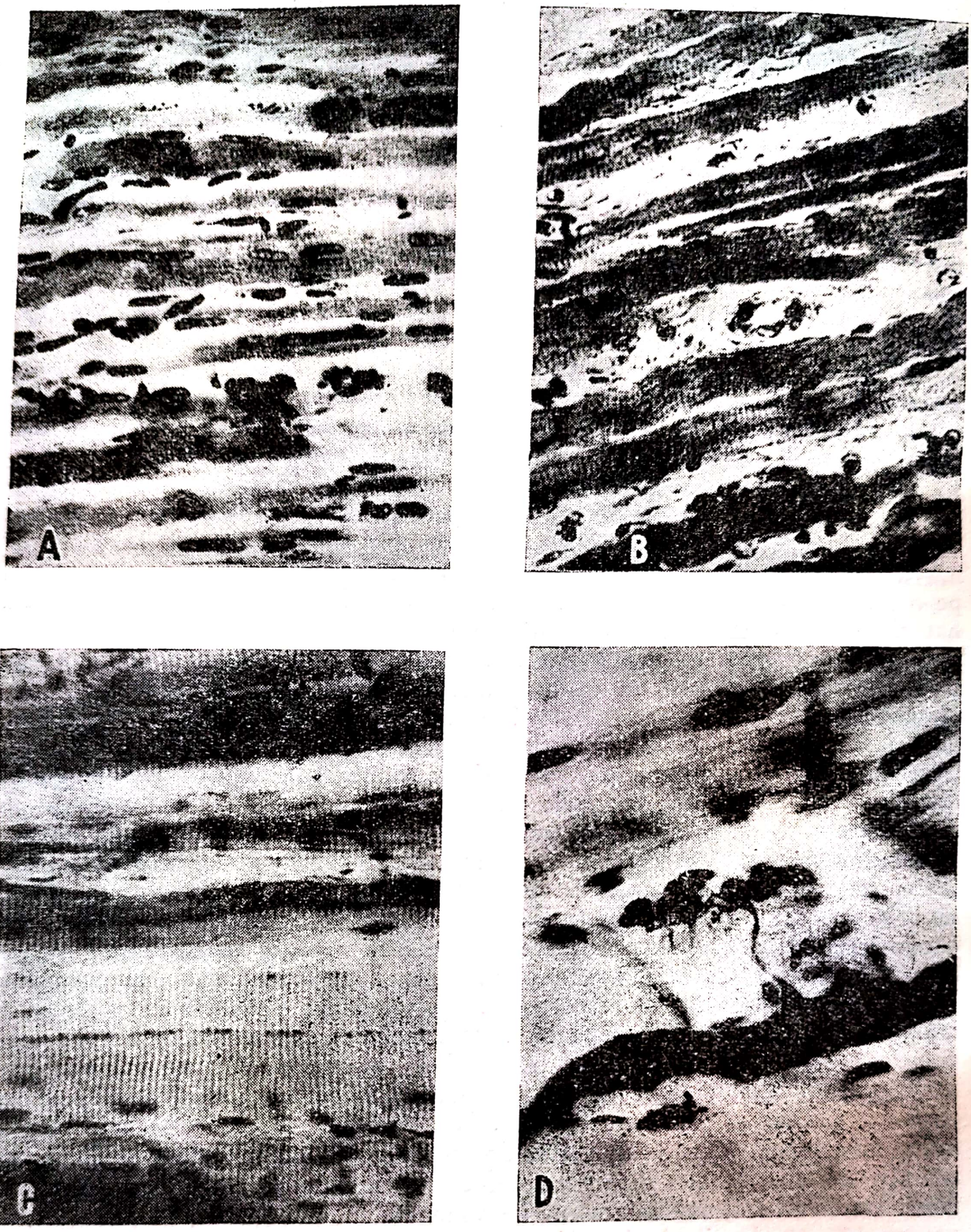


Fig. 20. — Histostructura unui mușchi independent autotransplantat.

A — la 14 zile după transplantare se observă schițarea unor noi fibre musculare; *B* — la 30 de zile după transplantare se observă fibrele musculare bine dezvoltate și apariția unui *endomisium*; *C* — la 6 luni de la transplantare, structura tipică a fibrei musculare este refăcută, însă cu dispoziția nucleilor în șiruri, demonstrînd încă existența unei diviziuni amitotice; *D* — la același interval de timp se pot evidenția plăci motorii tipice prin impregnare argentică [după Studitsky (497)].

Scanned with OKEN Scanner

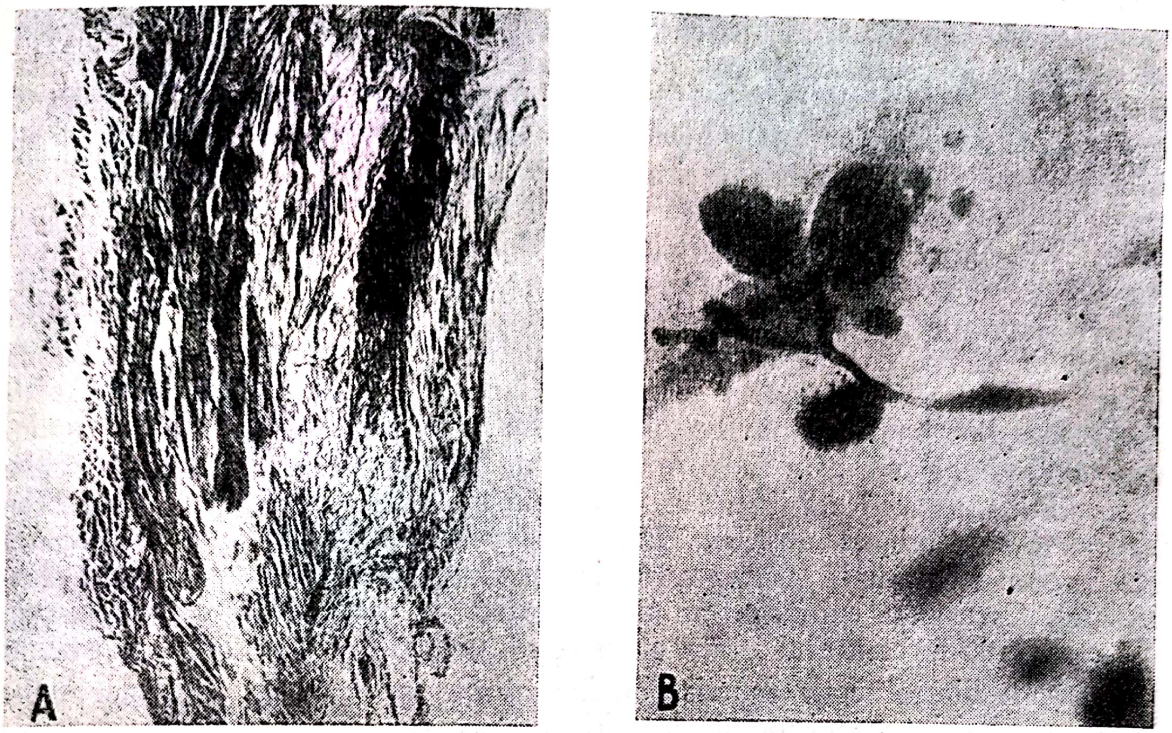


Fig. 21. — Histostructura unui mușchi independent homotransplantat la 3 luni după transplantare:

A — mușchi *gastrocnemius* de șobolan (impregnare argentică); a se observa dezvoltarea intensă a fibrelor nervoase între fibrele musculare; B — placă motorie (impregnare argentică) [după Studitsky (497)].

tului se necrozează, dar porțiunile periferice supraviețuiesc pînă cînd masa musculară se revascularizează, capătă o structură fibrilară normală și se reinervează (fig. 20).

S-a încercat folosirea acestei metode și pentru homotransplantarea mușchiului, considerîndu-se că, dacă dediferențierea, adică dezorganizarea țesutului muscular homografat este profundă, nu este exclus ca acțiunea agenților de rediferențiere, adică de reconstrucție, ai gazdei să poată modifica specificitatea antigenică a țesutului și să poată promova toleranța țesutului muscular străin. Experiențele de homografare musculară la animalele care nu au făcut parte din aceeași familie genetică au dat rezultate negative. La animalele din aceeași familie genetică s-au obținut rezultate asemănătoare acelora obținute în autotransplantarea mușchiului independent; refacerea structurilor fibrilare și reinervarea se produc după 3—4 luni de la homotransplantarea țesutului muscular (fig. 21 A și B). Însă, în acest caz, primele semne de activitate contractilă se înregistrează mai tîrziu decît în cazul autotransplantării mușchiului independent (497).

GREFELE DE CARTILAJ

Cartilajul este un țesut avascular format dintr-o matrice de condromucoproteine, conținînd condrocite și un număr variabil de fibre de colagen, reticulină și elastină. În multe tipuri de cartilaj, condrocitele persistă în cursul vieții, fără a suferi modificări și fără a fi înlocuite, dar aceasta nu înseamnă

Scanned with OKEN Scanner

totuşi că ele sînt inactive. Astfel, s-a arătat la şoarece că circuitul metabolic al sulfatului în condrocitele cartilajului costal este atît de rapid încît, la mai puţin de 24 de ore de la administrarea intravenoasă de sulfat-^{35}S, izotopul apare în aceste celule (104). În timp ce modelul constituţional de bază al matricei cartilajului, al celulelor şi al fibrelor cartilajului este tot timpul acelaşi, modelul de organizare se modifică pentru a se adapta unei game surprinzător de largi de mişcări la om. Cartilajele costale, de exemplu, acţionează ca nişte bare de torsiune, aducînd cutia toracică osoasă la o poziţie neutră după inspiraţie şi expiraţie profunde. Discurile intervertebrale sînt nu numai nişte amortizoare de şocuri, care apără integritatea creierului, ci ajută, de asemenea, la delimitarea mişcărilor coloanei vertebrale. Cartilajele asigură o rigiditate potrivită cavităţilor nazale şi pavilionului urechii. Cartilajele vocale permit modulaţii multiple ale vocii, în timp ce acelea ale traheei menţin bronhiile deschise în condiţiile creşterii presiunii exterioare sau a scăderii presiunii interioare. În articulaţii, ele asigură mişcările fără a se produce frecare şi se autorepară (ceea ce nu se întîmplă cu alte cartilaje ale căror leziuni se vindecă prin cicatrizare). Cartilajele epifizelor au un potenţial de creştere impresionant, prin ele realizîndu-se controlul exact al creşterii simetrice şi sincronice a oaselor.

Puţine dintre aceste funcţii pot fi suplinite şi, de aceea, cele mai multe dintre cartilajele organismului sînt atît de necesare, încît autotransplantarea lor nu poate avea decît scopuri foarte limitate. Unele dintre cartilajele costale inferioare pot fi rezecate cu tulburări ulterioare minime şi pot fi folosite pentru a înlocui cartilajele urechii, ale nasului sau pentru restaurarea conturului capului sau al feţei. Înlocuirea sau reconstituirea altor structuri cartilaginoase este posibilă numai prin homotransplantare. Fie că se efectuează o autotransplantare, fie că se efectuează o homotransplantare, cartilajul se comportă bine ca transplant independent, cu condiţia unei precauţii elementare şi anume aceea de a-l plasa în contact strîns cu ţesuturile gazdei. O grefă de cartilaj înconjurată de un cheag sanguin nu supravieţuieşte şi este surprinzător în prezent cît de frecvent se nesocoteşte în practica clinică sau în cercetarea experimentală această condiţie esenţială. Observaţiile privind supravieţuirea condrocitelor în homo- sau heterotransplantele de cartilaj sînt lipsite de valoare, dacă nu se ţine seama cu stricteţe de acest factor (158).

Cartilajul se poate homografa cu succes, deoarece nu declanşează reacţia gazdei (70, 95, 106, 129, 135, 258, 417, 433, 550, 554). Mai mult, s-a dovedit la iepuri că homografele de cartilaj nu numai că nu se elimină, ci continuă să crească, dacă au fost prelevate de la animale tinere (125). De asemenea, s-a constatat că, în homografe experimentale de cartilaj făcute la oameni, se găsesc celule care metabolizează sulfatul după 2 ani (162), sau chiar după 8 ani (161) de la transplantare. Două fapte demonstrează că aceste condrocite sînt celule originare şi nu celulele gazdei, care au repopulat matricea transplantului: a) nu s-a observat niciodată repopularea cu condrocite a unui cartilaj mort (158) şi b) structura cromatinei din aceste celule este aceea evidenţiată la donator (394).

Singura explicaţie logică a faptului că homografa de cartilaj nu este afectată de reacţia imunologică a organismului este aceea că matricea cartilaginoasă reprezintă o barieră fizică între condrocitele sale şi celulele receptorului şi că această matrice este prin ea însăşi inertă din punct de vedere antigenic

Scanned with OKEN Scanner

(96, 97, 158, 162, 393, 550). Situația homografei de cartilaj este analogă acelor condiții experimentale în care se obține supraviețuirea prelungită a unor homografe diverse, prin împiedicarea contactului celular dintre aceste homografe și receptor. De exemplu, homografele libere, în suspensie în umoarea camerei anterioare a ochiului, nu suferă consecințele reacției imunologice a receptorului, dacă nu devin aderente la iris (314) sau dacă sînt închise într-o membrană miliporoasă, care este impermeabilă pentru celule, dar permeabilă pentru lichidul interstițial (528, 541). Pe lîngă că sînt neeficiente în determinarea vreunui răspuns imunologic din partea gazdei, homografele de cartilaj nu sînt afectate în unele împrejurări nici dacă receptorul a fost sensibilizat în prealabil în mod specific (98).

În ultimul timp s-au făcut tentative de heterotransplantare a cartilajului: Krüger (258) a prezentat cazuri de supraviețuire a condrocitelor în cartilajul uman transplantat la iepure.

Faptul că autografele și homografele de cartilaj au aceeași cale evolutivă a început a fi exploatat în mod intens. Observațiile care urmează cu privire la unele tipuri de cartilaj și la valoarea lor în chirurgia reparatorie se aplică deopotrivă homografelor și autografelor.

Cartilajele costale. Funcția cartilajelor costale este asemănătoare unui resort, permițînd mobilizarea cutiei toracice în jurul unei poziții neutre. Matricea lor este tot timpul într-o stare de tensiune variabilă. Într-un segment de cartilaj costal, tensiunile se află într-un echilibru care înlătură orice tendință de deformare a segmentului. Cînd cartilajul costal este secționat, aceste forțe eliberate pot produce răsucirea segmentului și, în consecință, poate fi compromis rezultatul clinic. Tensiunile din cartilajul costal au fost măsurate prin tehnici adecvate (245), care au confirmat impresia clinică anterioară, potrivit căreia cartilajul costal trebuie să fie „cioplit" într-un anumit fel, după dispoziția acestor linii de forță și după scopul urmărit (160), pentru a nu se compromite rezultatul intervenției. Această prelucrare (fig. 22) nu se poate face decît în cazul cartilajelor coastelor a 7-a și a 8-a și, adesea, cînd se urmărește implantarea fermă a grefonului cartilaginos, este necesar să se preleveze cartilajul cu joncțiunea condro-costală (453). Cartilajele costale transplantate se integrează cu ușurință, dacă apoziția țesuturilor respective se menține și nu prezintă tendință de absorbție de-a lungul anilor. Davis și Gibson (109) citează un caz în care o asemenea grefă de cartilaj a durat aproape 40 de ani, prezentînd, potrivit vîrstei, o calcifiere normală. Histologic, s-a putut evidenția în acest caz doar o ușoară eroziune sau absorbție pe unele dintre suprafețele secționate ale grefei, dar pe nici una dintre suprafețele pericondrale. Eroziunea sau absorbția grefei cartilaginoase încetează foarte curînd după transplantare și are o importanță clinică mică de îndată ce nu interesează decît porțiuni foarte reduse ale acesteia. Ideea de a „sfărîma" sau secționa cartilajul în fragmente foarte mici și de a le injecta subcutanat pentru a corecta diverse depresiuni s-a dovedit nesatisfăcătoare. S-au obținut însă și rezultate încurajatoare în reducerea unor defecte, folosind fragmente cartilaginoase mari, în formă de cub (395).

Cartilajul nazal și cartilajul auricular. Dimpotrivă, grefele de cartilaj nazal se absorb de obicei (158) și același lucru se întîmplă și cu grefele de

Scanned with OKEN Scanner

cartilaj din ureche, dacă fragmentele grefate nu sînt mici (10, 162, 164, 312). Explicația cea mai plauzibilă a absorbției ultimului cartilaj după transplantare este riscul mare de constituire a unui cheag în jurul său, ca urmare a faptului că zona respectivă este foarte vascularizată.

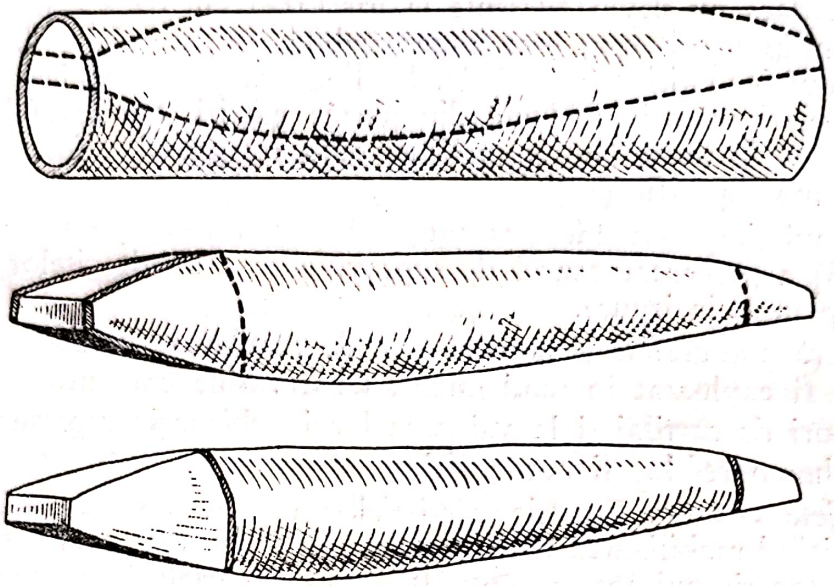


Fig. 22. — Modul de prelucrare a unui segment de cartilaj costal, după principiul secționării încrucișate echilibrate, în vederea folosirii sale pentru corectarea unei prăbușiri a septului nazal [după Gibson și Davis (160)].

Cartilajul articular. Homografele de cartilaj articular ar putea avea o considerabilă aplicare clinică. Rezultatele încercărilor de a transplanta o articulație în întregime s-au soldat cu eșecuri, iar perspectiva de a folosi numai cartilajul articular, care este foarte subțire și fragil, nu a atras mulți partizani. Se recomandă în ultima vreme ca o parte din metafiză, groasă de 2—3 mm, să fie prelevată o dată cu cartilajul articular, ca suport, dat fiind că țesutul osos s-a dovedit a nu se elimina, ci, dimpotrivă, a se integra în organismul receptorului. Vitalitatea cartilajului se poate urmări prin captarea de sulfat-^{35}S. Pe baza acestor observații s-a încercat pînă acum la cîine transplantarea capului femural, folosindu-se cartilajul articular și un strat subțire de țesut osos (158), iar la om și refacerea suprafeței articulare cu cartilaj prelevat de la cadavre (117).

Cartilajul epifizei. Acest cartilaj a putut fi homotransplantat de asemenea, dar această homografă s-a dovedit a nu avea valoare clinică, pentru că, deși celulele cartilajului supraviețuiesc și proliferează după transplantare, suferă reacția imunologică a organismului, pe măsură ce ele se diferențiază în osteoblaste (451).

Condrocitele izolate. Recent, Moskalewski și Kawiak (349) au transplantat în mușchiul striat al iepurilor masculi condrocite izolate din cartilajul septului nazal de la iepuroaice, folosind acțiunea conjugată a tripsinei și cola-

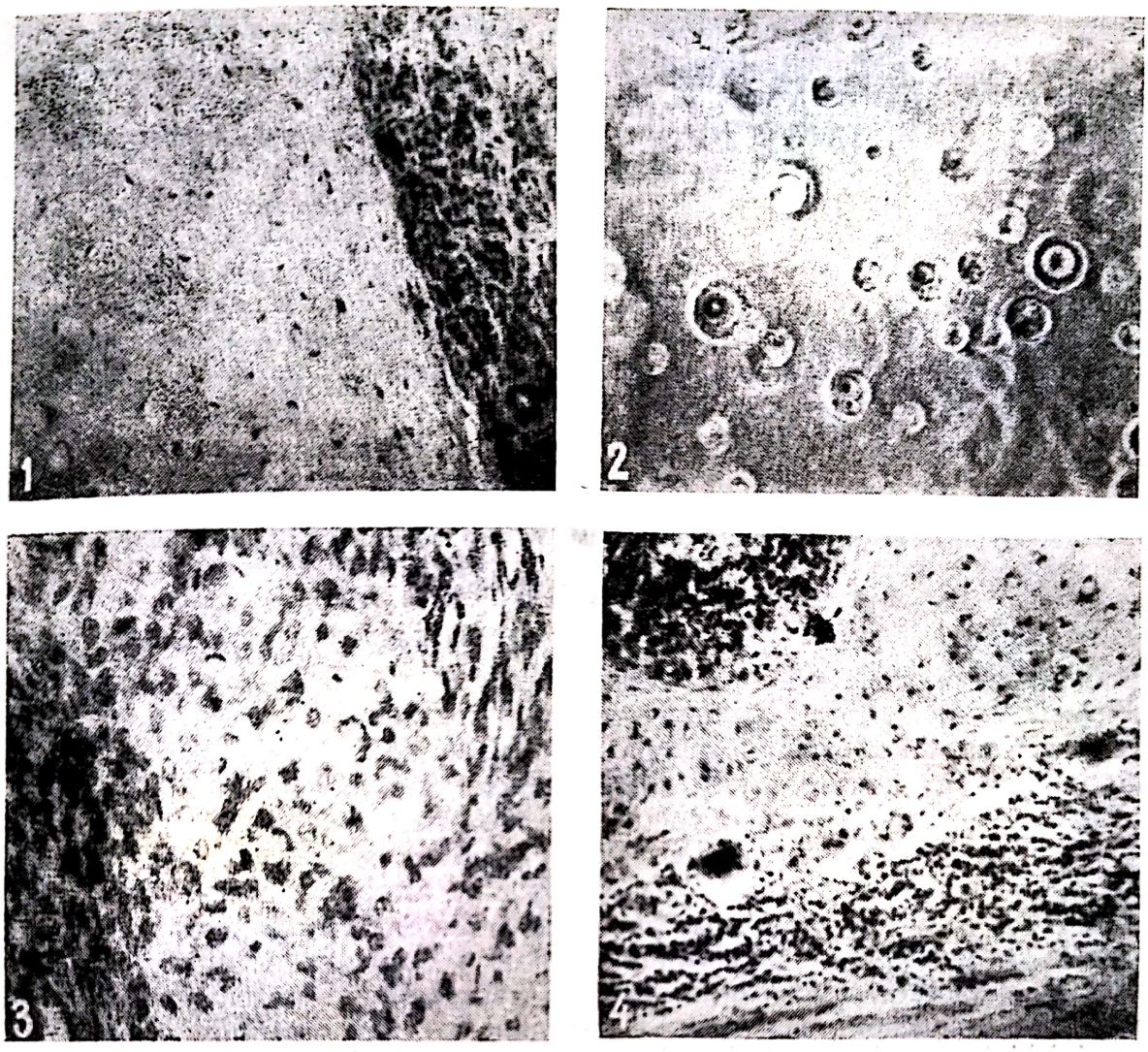


Fig. 23

1 — Cartilajul septului nazal cu mucoasa aderentă, care conţine numeroase structuri glandulare. Vacuole mari lipidice şi comprimarea nucleilor spre periferie se observă în condrocite (× 200); *2* — condrocite izolate, în care apar foarte evident aceleaşi vacuole (contrast de fază, × 400); *3* — cartilaj format după 7 zile de la transplantarea condrocitelor izolate. Se observă substanţă interstiţială imatură, lipsa unei delimitări precise de ţesutul conjunctiv înconjurător şi vacuole lipidice în condrocite (× 400); *4* — cartilaj format după 28 de zile de la transplantarea condrocitelor. De remarcat asemănarea cu cartilajul septal, infiltraţia cu limfocite şi trei celule gigante multinucleare de alt tip (× 400) [după Moskalewski şi Kawiak (349)].

genazei; astfel, au reuşit să obţină un cartilaj asemănător din punct de vedere morfologic celui din care ele au fost izolate (fig. 23). Această observaţie confirmă altele anterioare (209, 493); nu se cunosc însă date care să ateste că fenomenul este comun şi altor specii de mamifere. Inducţia formării ţesutului osos şi cartilaginos se întîlneşte frecvent la iepure. Bridges şi Pritchard (58) au observat că muşchiul devitalizat, grefat sub capsula renală, generează cartilaje. De asemenea, s-a arătat că injectarea de alcool şi extracte de ţesuturi în muşchiul de iepure generează structuri osoase la locul administrării (203, 205). Prin urmare, formarea de cartilaje după transplantarea condrocitelor izolate se poate datori fie capacităţii lor de a „secreta" substanţă intercelulară, fie fenomenului de inducţie amintit. Folosind marcarea naturală a celulelor (cromatina de sex), Moor

Scanned with OKEN Scanner

și Barr (348), Peer (394) și Moskalewski și Kawiak (349) au demonstrat că formarea de cartilaje după transplantarea condrocitelor se datorește activității acestor celule și nu fenomenului de inducție. În culturi, condrocitele elaborează mai ușor substanța intercelulară cînd sînt dispuse în conglomerate decît atunci cînd se află în monostraturi (209). Capacitatea condrocitelor de a sintetiza substanța interstițială a cartilajului, apreciată după încorporarea sulfatului-^{35}S în condroitin-sulfat (127), persistă la animalele adulte (107, 400) și ar putea fi utilizată pentru studii interesante de fiziologie. De exemplu, prin experiențe similare de transplantare s-ar putea stabili în ce măsură variatele particularități morfologice și funcționale ale cartilajelor din diverse părți ale organismului sînt determinate genetic și în ce măsură ele pot fi influențate de factorii de mediu.

B. SURSE DE ORGANE ȘI ȚESUTURI PENTRU TRANSPLANTARE LA OAMENI ȘI ASPECTELE DEONTOLOGICE ALE FOLOSIRII ACESTOR SURSE

În această privință, fiecare organ ridică probleme particulare: în primul rînd, pentru organele unice, ca ficatul și inima, donatorii în viață sînt în afara oricărei discuții. Aceeași atitudine trebuie luată chiar în cazul unor organe pereche, cum sînt plămînii, dat fiind că ablația unui plămîn este urmată de mari dificultăți funcționale, care primejduiesc viața bolnavului; în al doilea rînd, capacitatea diferitelor organe de a-și menține viabile structurile în ultima perioadă de viață a unui muribund și în perioada de ischemie, care urmează imediat morții, variază mult de la un organ la altul; în al treilea rînd, evoluția receptorului după transplantarea unui organ este condiționată într-o mare măsură de posibilitățile organismului său de a compensa pe alte căi absența inițială, temporară, a activității organului transplantat. De exemplu, receptorul unui homotransplant renal poate fi menținut în viață săptămîni întregi, fără ca rinichiul transplantat să funcționeze, prin hemodializă intermitentă, în timp ce supraviețuirea receptorului după transplantarea ficatului este condiționată de restabilirea rapidă a activității transplantului.

Posibilitatea de a folosi animalele ca donatori nu poate fi evaluată în prezent, cu toate că există unele date încurajatoare în acest sens. Aceasta este însă soluția optimă a problemei surselor de organe și țesuturi pentru transplantare și va deveni aplicabilă în momentul în care se vor cunoaște modalitățile specifice, imunologice, de a înlătura rejecția oricărui fel de transplant.

În cele ce urmează vor fi prezentate problemele particulare pe care le ridică procurarea fiecărui organ în parte pentru transplantare. Experiența amplă obținută în transplantarea rinichiului justifică întîietatea acestui organ în prezentarea acestor probleme.

1. SURSE DE RINICHI PENTRU TRANSPLANTARE

Pînă în prezent au fost folosite trei surse de rinichi pentru transplantare la oameni și anume: donatori umani în viață, donatori animali în viață, cadavre umane. S-a recurs însă mai frecvent la donatori voluntari de rinichi

Scanned with OKEN Scanner

decît la rinichi de cadavre umane sau rinichi prelevați de la animale vii, cu toate implicațiile etice ale unei asemenea preferințe (71, 544).

a) **Donatori umani în viață.** Un chirurg care-și propune să excizeze un rinichi sănătos de la un donator în viață, în scopul de a-l transplanta, își asumă mari responsabilități. Pe baza cunoștințelor noastre actuale nu se poate face decît o estimare probabilă, cu totul aproximativă, cu privire la reușita unei transplantări de organ, fie chiar și de rinichi. În chirurgia care nu implică transplantarea vreunui țesut sau organ, ceea ce trebuie avut în vedere este numai starea bolnavului. Dacă însă se transplantează rinichi prelevați de la donatori în viață trebuie să se ia în considerație și riscurile nefrectomiei unilaterale a acestor oameni sănătoși, chiar după ce se iau toate măsurile pentru a se stabili dacă cei doi rinichi ai donatorului funcționează în mod efectiv. Riscurile nefrectomiei sînt mici, dar nu sînt neglijabile; există posibilitatea de îmbolnăvire a rinichiului rămas al donatorului.

O problemă deontologică specială apare atunci cînd transplantarea unui rinichi se face între gemeni sub vîrsta majoratului. Se ridică în acest caz întrebarea dacă un copil poate înțelege implicațiile hotărîrii de a dona un rinichi. O anchetă efectuată într-un mare spital din Boston a stabilit că în aceste cazuri, traumatismul psihologic al pierderii unui frate (soră geamănă) este mai puternic decît cunoașterea dezavantajelor unei nefrectomii la un tînăr sănătos [Murray, citat de (71)] și că, deci, decizia de a dona un rinichi este luată într-o condiție psihologică nepotrivită.

Din datele prezentate în tabelul 1 reiese clar că foarte mulți oameni au pierdut un rinichi cu un cîștig mic (dacă a existat!) pentru receptor și că, deși rinichii provenind de la donatori în viață înrudiți cu receptorul au fost transplantați cu mai mult succes decît acei care au fost obținuți de la donatori în viață, neînrudiți cu receptorul, homotransplantele renale de la cadavre par a evolua aproape la fel de bine ca și acelea de la donatori în viață neînrudiți cu receptorul.

Dezavantajele folosirii donatorilor în viață. Aceste dezavantaje sînt condiționate de riscurile nefrectomiei, presiunea morală exercitată asupra donatorului de cei din jurul său și problema despăgubirii materiale a donatorului.

Riscurile nefrectomiei. Numeroși donatori sănătoși de rinichi au suferit infecții severe postoperatorii și tulburări tensionale; uneori, unicul rinichi al donatorului a prezentat semne clinice de glomerulonefrită. Dacă folosirea donatorilor sănătoși în viață va continua, este probabil ca statistica acestor riscuri să se amplifice. Nefrectomia în aceste scopuri este o operație mai hazardată decît o nefrectomie de rutină, dat fiind că vasele renale trebuie să fie mobilizate extensiv și secționate cît mai aproape de joncțiunea lor cu aorta și vena cavă. Pe de altă parte, chirurgul care execută nefrectomia la donator este obligat să-și sincronizeze operația cu evoluția pregătirii chirurgicale a receptorului.

Presiunea morală asupra donatorului. Asupra donatorului se pot exercita, în mod direct sau indirect, presiuni morale din partea rudelor, fără ca medicul să aibă cunoștință de acest fapt. Donatorul poate accepta fără satisfacție să-și cedeze rinichiul sau poate rămîne cu impresia că s-a făcut vinovat față de cei apropiați lui și față de bolnav dacă refuză să devină donator de rinichi.

Scanned with OKEN Scanner

Dezvoltarea unui sistem satisfăcător de procurare a organelor, în afara unor asemenea complicaţii de ordin moral, ar scuti medicul de o problemă foarte dificilă. Poate că valoarea cea mai mare a posibilităţii de a conserva organe pentru transplantare constă în eliminarea acestor donatori „din obligaţie".

Despăgubirea materială a donatorului. Este posibil ca o recompensă bănească sau alte beneficii să fie oferite donatorului pentru un rinichi. Acest aspect al transplantării renale distonează cu efortul profesional reclamat de o asemenea intervenţie şi cu profesiunea medicală însăşi şi poate deschide căi de şantaj ulterior asupra receptorului sau familiei sale.

Avantajele folosirii donatorilor în viaţă. Aceste avantaje constau în posibilitatea de a evita sau a reduce la minim leziunea ischemică a rinichiului transplanat şi, deci, de a asigura o funcţie renală postoperatorie mai eficace, în posibilitatea de a selecţiona donatorii dintre persoane înrudite şi în posibilitatea de a încerca tipizarea tisulară, în aşa fel încît să nu se realizeze combinaţii donator-receptor neconvenabile.

Clinicienii au puncte de vedere diferite în evaluarea acestor avantaje. Unii presupun că folosirea donatorilor în viaţă este pe deplin justificată, atît timp cît ea conferă bolnavilor cea mai sigură „şansă" posibilă. Totuşi, în prezent, nu dispunem de multe supravieţuiri de lungă durată, pentru a adopta fără rezerve această părere. Fără îndoială că o metodă mai bună de tipizare a ţesuturilor ar face să se obţină rezultate mai bune, dar pînă acum nu s-au pus la punct asemenea metode, deşi încă din 1963 s-au publicat în acest sens lucrări încurajatoare (56). Chiar cînd s-au efectuat transplantări de rinichi între gemeni identici (monovitelini), nu s-au obţinut rezultate de foarte lungă durată, dat fiind că deseori în rinichiul transplantat s-au dezvoltat leziunile bolii originare de care a suferit înainte receptorul.

Numeroşi cercetători optează pentru prelevarea rinichilor ce urmează a fi transplantaţi de la cadavre sau de la donatori la care nefrectomia se face în beneficiul donatorului însuşi. Totuşi, utilizarea rinichilor de la donatori în viaţă, înrudiţi îndeaproape cu receptorul, a dat pînă în prezent cea mai mare proporţie (aproximativ 30%) de transplantări renale reuşite, adică de supravieţuire de minim 1 an (544).

Decizia de a folosi sau nu un donator în viaţă rămîne deci o problemă individuală a clinicianului interesat, de vreme ce datele existente în literatură sînt limitate sau pot interveni situaţii în care rudele bolnavului se oferă insistent pentru a dona rinichiul pentru transplantare.

În transplantarea rinichilor de la cadavre, înainte de a se fi produs leziuni ischemice ireversibile în organ, există fără îndoială dificultăţi de ordin practic, dar aceste dificultăţi, implicînd bunăvoinţa individuală şi legislaţia locală, nu sînt totuşi probleme fără rezolvare.

Selecţionarea donatorilor. În cazul că receptorul şi donatorul disponibil sînt gemeni, este de o extremă importanţă să se stabilească dacă ei sînt gemeni identici. Astfel, gemenii trebuie să fie de acelaşi sex, să aibă acelaşi grup sanguin (71), iar testul grefării reciproce de piele să arate existenţa histocompatibilităţii tisulare între ei (364) (adică grefa de piele de 3 cm^2 schimbată între donator şi receptor să nu fie eliminată timp de 6 săptămîni).

Dacă din punct de vedere etic, situaţia este satisfăcătoare atît pentru medic, cît şi pentru donator şi receptor, donatorul în viaţă urmează a fi

Scanned with OKEN Scanner

investigat, în mod obligatoriu în condiţii de spitalizare, în privinţa funcţiei ambilor săi rinichi (condiţiile de a fi acceptat ca donator fiind aortorenografie normală, probe funcţionale renale normale, cuprinzînd ureea sanguină, *clearance-ul* creatininei, capacitatea de a dilua şi concentra urina, precum şi urocultura sterilă, depozit urinar normal după centrifugare şi lipsa oricărui constituent chimic anormal în urină).

Un grup particular de donatori în viaţă, foarte convenabil din punct de vedere etic, este constituit de acei bolnavi la care se practică ablaţia unui rinichi sănătos, pentru a se face cura unei alte afecţiuni, cum ar fi anastomoza uretero-subarahnoidiană, tulburările de dezvoltare a ureterului etc.

În cazul donatorilor în viaţă este foarte important să se epuizeze toate posibilităţile de precizare a compatibilităţii imunologice dintre donator şi receptor, incluzînd atît compatibilitatea de grup sanguin, cît şi compatibilitatea tisulară (165).

Practica clinică actuală a unei transplantări renale de la un donator în viaţă reclamă sincronizarea perfectă a activităţii a două echipe chirurgicale, care să lucreze în săli de operaţie alăturate, aşa încît să fie posibil pentru chirurgul care explorează vasele receptorului să inspecteze cu uşurinţă rinichiul donatorului înainte de a se fi secţionat artera acestuia. Vasele rinichiului donatorului urmează a fi clampate şi secţionate numai după ce vasele receptorului au fost pregătite. Sutura vasculară (arterială şi venoasă) trebuie făcută în timpul cel mai scurt posibil, mai precis sub 30 de minute. Unii autori procedează la răcirea rinichiului înainte de transplantare, perfuzîndu-l cu soluţii saline reci, cu sau fără adaos de coloizi, heparină şi substanţe spasmolitice, ca procaina sau papaverina. Se pare însă că, dacă se utilizează donatori în viaţă şi dacă anastomozele vasculare se efectuează într-un timp mai mic de 30—40 de minute, aceste manevre nu mai sînt necesare (71).

Este foarte greu să se impună în atitudinea tactică a chirurgului o anumită standardizare. Din punct de vedere moral, chirurgul se face responsabil de orice defecţiune tehnică în stare să favorizeze eliminarea rinichiului transplantat (studiul insuficient al compatibilităţii imunologice, ischemia prelungită intraoperatorie fără răcirea prealabilă a rinichiului etc.).

b) **Heterotransplantele de rinichi.** Primele asemenea tentative clinice s-au făcut prin folosirea de rinichi de cimpanzeu (425, 426) sau de baboon (208), cea mai lungă supravieţuire fiind înregistrată în primul caz (9 luni), bineînţeles sub tratament imunosupresor (imuran şi corticosteroizi). Celelalte încercări de heterotransplantare clinică a rinichiului, foarte puţine la număr, au permis o supravieţuire mai mică de 2 luni.

Cu tot impasul actual în heterotransplantarea organelor, se pare că în această soluţie se pun multe speranţe. Folosirea animalelor ca donatori de organe elimină o serie din dezavantajele etice menţionate şi micşorează perioada de ischemie din cursul transplantării, implicit gravitatea leziunilor ischemice. Pe de altă parte, posibilitatea de a utiliza animalele ca donatori de organe ar rezolva problema sursei de organe unice (ficat, inimă), care nu vor putea fi prelevate niciodată de la donatori în viaţă şi care s-au dovedit nesatisfăcătoare funcţional cînd au fost prelevate de la cadavre, din cauza deteriorării rapide, *post mortem*, a acestor ţesuturi.

Scanned with OKEN Scanner

c) **Cadavrele umane ca sursă de rinichi pentru transplantare.** Deşi nu s-au obţinut încă date care să confirme supravieţuirea de lungă durată a homotransplantelor renale recoltate de la cadavre umane, sînt autori (290) care consideră că un program judicios de dializă cronică a receptorului şi oarecare măsuri de cruţare a organului transplantat pot asigura totuşi succese de care trebuie să se ţină seama. Două obstacole de ordin moral stau în faţa folosirii cadavrelor umane ca surse de organe. Cel dintîi este condiţionat de permisiunea de a preleva organul, iar cel de-al doilea de diagnosticul morţii.

În general, nu este uşor de a solicita de la rude rinichii unui bolnav care este pe patul de moarte, în ciuda tratamentelor făcute şi cu atît mai dificil ar fi să se ceară acest lucru bolnavului însuşi. Prima alternativă este cea mai recomandabilă şi oricum obligatorie. Permisiunea de prelevare a unui rinichi de la aceşti bolnavi trebuie cerută în timp util, pentru a se da posibilitate rudelor de a se obişnui cu o asemenea idee, de a delibera şi de a se informa precis asupra situaţiei bolnavului.

Următoarele precauţii sînt indispensabile cînd se pune problema prelevării unui rinichi pentru transplantare de la cadavru: a) excluderea unei boli renale sau a hipertensiunii la donator; b) evitarea hipotensiunii de lungă durată înainte de moarte, pentru a nu se produce necroza tubulară; c) excluderea septicemiei, a bacteriemiei şi a infecţiilor căilor urinare ale donatorului înainte de a muri; d) excluderea posibilităţilor pe care o implică bolnavii neoplazici de a avea depozite carcinomatoase în rinichi, care să fi scăpat investigaţiilor de laborator.

Este interesant de semnalat că, în literatură, se cunosc cazuri cînd transplantarea unui rinichi de la un donator neoplazic a fost urmată de metastazarea receptorului, metastazele înscriindu-se în tipul tumorii donatorului (299, 311).

Cele mai potrivite cazuri din punctul de vedere al transplantării rinichilor sînt bolnavii care mor rapid cu tumori cerebrale, traumatisme cerebrale şi tromboze coronariene. În unele dintre aceste cazuri, intervenţia procurorului în permisiunea folosirii rinichiului pentru transplantare este obligatorie. Este foarte puţin probabil ca să devină donatori de rinichi cadavrele accidentaţilor de circulaţie, dat fiind că în cazul lor prelevarea organelor nu se poate face în timp util din motive juridice.

În privinţa diagnosticului morţii, metodele tradiţionale de diagonstic au devenit inaplicabile o dată cu dezvoltarea recentă a chirurgiei cardiace, care foloseşte circulaţia extracorporeală şi hipotermia profundă sau disociată. De asemenea, metodele artificiale de resuscitare fac dificilă deseori însăşi hotărîrea de a înceta tentativele de resuscitare. Esenţial este ca orice decizie în legătură cu tratamentul viitorului receptor de rinichi să fie luată în funcţie de starea viitorului donator de rinichi şi în nici un caz dorinţa de a preleva rinichiul acestuia într-o cît mai bună stare funcţională nu trebuie să influenţeze tratamentul său medical.

La bolnavii care se află în comă în urma unor leziuni cerebrale şi care sînt supuşi respiraţiei artificiale prin traheostomie, se poate întrerupe respiraţia artificială numai dacă după o perioadă de timp suficientă nu apare nici un semn de recuperare cerebrală. A preleva un rinichi pentru folosirea sa

Scanned with OKEN Scanner

într-un caz care reclamă transplantarea renală este o măsură rațională, dar dacă decizia de a deconecta aparatul de respirație artificială este determinată numai de dorința de a procura un rinichi, atunci întreaga acțiune devine incompatibilă cu etica medicală.

Un bolnav care se află în hipotermie poate supraviețui în stop cardiac o perioadă de timp considerabilă, cu condiția ca hipotermia să fie menținută sau să se folosească această metodă alternativ cu un *by-pass* artificial. În unele cazuri, în chirurgia cardiacă, șansa de a recupera un bolnav poate să fie nulă, cum se întîmplă în marile rupturi ale inimii cu exsanguinare. În această situație, chirurgul poate abandona operația dar această decizie nu trebuie să fie determinată de dorința de a preleva un rinichi sănătos pentru transplantare.

Unui bolnav care face în condiții de spitalizare un stop cardiac i se practică în mod obișnuit masajul cardiac și, deseori inima își reia activitatea, fără să se fi instalat alte tulburări. Dacă într-o asemenea împrejurare există semnele apariției unor leziuni cerebrale grave, atunci se poate renunța la masajul cardiac, dacă se produce un nou stop circulator. Încă o dată subliniem însă că și în acest caz, decizia de a nu se mai întreprinde nici o tentativă de resuscitare cardiacă nu trebuie să fie influențată de necesitatea unui rinichi pentru transplantare.

În ciuda dificultăților menționate mai sus, s-au stabilit condițiile de folosire a cadavrului uman ca donator de rinichi, pe care le reproducem după Calne (71): a) să existe promisiunea scrisă a rudelor apropiate și a organelor juridice, dacă este cazul; b) să nu existe nici un semn de leziune renală severă sau boală hipertensivă; c) să nu existe focare infecțioase în rinichi sau în apropierea rinichiului; d) să nu existe nici un motiv de a se considera că rinichiul se află în dezvoltare; e) donatorul să nu aibă o vîrstă mai mare de 70 de ani; f) moartea să se fi produs după tratamentul prescris pentru afecțiunea respectivă, iar inima să fi încetat să bată de cel puțin 5 minute în condiții de normotermie.

Bineînțeles că este foarte important ca transplantarea renală să se execute cît mai rapid posibil. S-a încercat răcirea cadavrului înainte de prelevarea rinichiului (295), dar pentru realizarea acestei măsuri este necesar un aparat de perfuzie artificială, iar tehnica este complicată și necesită timp. Dat fiind că acest mod de răcire nu este deosebit de eficient, se preconizează să se execute perfuzia și răcirea rinichiului după prelevarea sa (71). Irigarea rinichiului poate fi, practic, menținută după încetarea activității cardiace prin masaj cardiac intern sau extern, pînă în momentul în care el este prelevat, dar există în acest caz riscul ca inima să-și reia spontan bătăile, ceea ce ar duce la crearea unei situații dificile pentru chirurg mai ales, dacă prelevarea rinichiului este în curs.

d) **Transplantul renal secundar.** Este binecunoscut, și asupra acestui fapt se va insista într-un capitol următor, că după imunizarea unui animal printr-un prim homotransplant de țesut sau organ, al doilea homotransplant provenind de la același donator este eliminat mai rapid decît cel dintîi. O a doua homogrefă de piele de la un alt donator este de asemenea eliminată mai rapid decît homografa primară, însă nu la fel de rapid ca homografa secun-

Scanned with OKEN Scanner

dară prelevată de la donatorul de la care s-a prelevat și grefa primară (313). Totuși, Billingham și Sparrow (41) și Billingham (36), lucrînd pe iepuri, au constatat că supraviețuirea homogrefei de piele este prelungită de administrarea intravenoasă prealabilă a unor celule epidermice de la donatorul de piele, iar Werder și Hardin (535) au arătat la șoarece că transplantarea repetată a pielii de la diferiți donatori la același receptor duce la prelungirea supraviețuirii ultimelor grefe.

În ciuda acestei evidențe experimentale, s-au făcut totuși tentative de homotransplantare secundară la om a rinichiului de la un alt donator, după ce primul rinichi homotransplantat a devenit insuficient (217, 416, 461). Pentru justificarea acestor tentative s-au invocat cercetările lui Dempster (113, 114) și Simonsen și colab. (470), care au găsit că, la cîine homotransplantul renal secundar de la alt donator decît al homotransplantului renal primar se elimină mai lent decît homotransplantul renal secundar de la același donator. De asemenea, s-a apelat la cercetările lui Gordon și Richards (169), care au dovedit la această specie că transplantări secvențiale multiple ale rinichiului de la donatori diferiți se pot face fără prejudicii și la cercetările lui Zukoski și colab. (560), care au reușit să mențină în funcțiune, prin tratament imunosupresor, rinichi de cîine homotransplantați secundar, prelevați de la aceleași animale de la care s-au prelevat rinichii homotransplantați primar.

Cazurile de homotransplantare renală secundară sînt puține și nu se pot face aprecieri sigure asupra validității unei asemenea acțiuni. Singura lor justificare reală, actuală, este faptul că permit prelungirea supraviețuirii unui bolnav cu cîteva luni. Ele însă pun probleme de ordin moral în privința donatorului, mai dificile decît acelea implicate de homotransplantarea renală primară. De aceea considerăm că atitudinea cea mai potrivită în eventualitatea unei transplantări renale secundare sau terțiare este prelevarea rinichilor de la cadavre, cu toate că funcția unor asemenea homotransplante renale este inferioară acelora prelevate de la donatori umani în viață (218, 416) sau de la primate în viață.

2. SURSE DE INIMĂ PENTRU TRANSPLANTARE

Selecționarea cazurilor pentru transplantarea inimii. O problemă importantă, cu implicații morale largi, poate chiar mai importantă decît soluționarea problemelor imunologice ale transplantării organelor, este, în cazul inimii, selecționarea receptorilor. Chiar dacă se ignorează considerentele medico-legale, emoționale, morale sau sociale, stabilirea unor criterii de selecționare, care să se adapteze tuturor cazurilor, pare aproape imposibilă. O boală de inimă care astăzi este netratabilă poate beneficia de tratament într-un viitor apropiat. Posibilitatea ca decizia pentru transplantarea inimii să fie luată numai după ce nu s-au obținut rezultate efective dintr-o intervenție corectoare, ar ușura foarte mult rezolvarea acestei probleme.

Cel puțin pentru momentul de față este rațional să se presupună că indicații majore de transplantare a inimii au doar acele boli care în mod neîndoielnic duc la moarte într-un timp mai scurt de cîteva luni. Asemenea boli, selecționate din grupa vîrstelor pediatrice, ar fi: inima biloculară, atrezia val-

Scanned with OKEN Scanner

vulară mitrală sau tricuspidă, scleroza endocardică sau *truncus arteriosus*. Aproximativ 75% din decesele prin boli cardiace congenitale au loc pe seama primului an de viață și acest fapt face foarte dificilă disponibilitatea de inimi pentru transplantare.

Selecționarea cazurilor în grupa adultă este numai în aparență mai puțin dificilă. Astfel, un efort fanatic de transplantare a inimii pentru a reanima un organism mort este, neîndoielnic, fără valoare. Pentru o decizie în favoarea unei asemenea intervenții trebuie să existe unele premise de succes. Donatorul nu poate fi la îndemînă oricînd, cu atît mai mult, cu cît el trebuie să fi încetat din viață recent. Pe de altă parte există miopatii sau boli coronariene generalizate, greu de diagnosticat în timpul vieții și chiar după aceea: cancerul inimii, deși rar, poate fi diagnosticat și mai rar preoperator. În asemenea situații, pe ce s-ar putea întemeia certitudinea că s-a efectuat transplantarea unei inimi normale?

Transplantarea neprevăzută a inimii în caz de infarct miocardic sau insuficiență cardiacă acută trebuie făcută cu mai multe rezerve decît o transplantare planificată cu grijă la un bolnav care este pe moarte, dar nu mort.

Diagnosticarea morții donatorului. În cazul folosirii homografelor cardiace, o problemă la fel de dificilă, ca aceea a selecționării receptorilor, este problema stabilirii morții donatorilor potențiali. Inima trebuie să fie viabilă în momentul transplantării, chiar dacă donatorul a fost mort în momentul prelevării ei. Resuscitarea sa trebuie să se facă *in vitro*, după ce a încetat să bată la donator; în nici un caz resuscitarea inimii donatorului nu poate fi făcută atît timp cît ea se mai află în toracele său.

Toate acestea ar putea conduce la situația ca aplicarea transplantării cardiace la om să nu poată trece prin faza homografei, așa cum s-a întîmplat cu corneea, pielea, rinichiul și într-o măsură mai mică cu plămînul, ficatul sau splina. Funcția inimii și locul ei în conștiința omului par a fi incompatibile cu asemenea intervenții.

Poate că soluția cea mai potrivită pentru cazurile umane care reclamă înlocuirea inimii ar fi heterotransplantarea ei. Dar și aici apar o serie de inconveniente, în afara celor de ordin imunologic, și anume faptul că toate primatele suferă de boli degenerative cardio-vasculare și că printre ele nu se găsește o specie de donatori heterologi cu un ritm de dezvoltare cardiacă comparabil cu acela ale omului.

3. SURSE DE PLĂMÎN PENTRU TRANSPLANTARE

Pînă acum, plămînul nu a putut fi conservat mai mult de 90 de minute (durata totală de la întreruperea irigației înainte de prelevare pînă la restabilirea irigației după transplantare). Conservarea sa de mai lungă durată nu este încă posibilă și cu atît mai mult nu este posibilă crearea de „stocuri de plămîni". Deci, donatorul de plămîn trebuie să fie anticipat printre bolnavii muribunzi și în acest caz instituirea hipotermiei acestuia ar servi ca mijloc adjuvant în menținerea viabilității țesutului pulmonar între incizia organului și transplantarea sa. Se recomadă în mod imperativ ca să se execute heparinizarea generală a donatorului înainte de a preleva organul și să se administreze

Scanned with OKEN Scanner

cantităţi suplimentare de heparină, chiar în vasele pulmonare, după ce toracele donatorului a fost deschis. Pericolul trombozelor în acest organ pare a fi mai mare decît în altele. În scopul prevenirii lor se preconizează de asemenea să se asigure irigaţia minimă a organului prin orice mijloc (masaj cardiac, excitaţie electrică a inimii, circulaţie extracorporeală) şi ventilaţia sa pînă în momentul exciziei.

Aceste măsuri implică, la fel ca şi în cazul altor organe, de a lua o decizie asupra donatorului înainte ca el să fi murit.

4. SURSE DE FICAT PENTRU TRANSPLANTARE

Sursa de ficat pentru transplantare are o importanţă deosebită, la fel ca şi pentru celelalte organe. Pentru obţinerea homotransplantelor hepatice umane, disponibilitatea este mult mai discutabilă decît în cazul rinichiului, cu toate că, la om, spre deosebire de cîine, ele pot fi prelevate de la cadavre. Deşi perfuzia extracorporeală în condiţii de hipotermie conferă oarecare protecţie ţesutului hepatic prelevat de la cadavru, această metodă poate fi utilizată numai dacă organul a stat neirigat o perioadă mai lungă, dat fiind că ea poate fi cauza unor tulburări ulterioare de irigaţie (295). La om, sindromul de blocare a irigaţiei hepatice după transplantare nu a fost descris. Cu toate acestea, în toate cazurile de homografe hepatice au fost evidenţiate modificări biochimice care dovedesc afectarea severă a parenchimului (259, 486). Din cauza intensităţii acestor modificări se poate pune problema dacă nu este mai potrivit ca, pentru transplantarea ficatului, să se utilizeze ca donatori primate subumane în loc de cadavre umane. Precedentul a fost creat cu rinichi de cimpanzeu, care au fost transplantaţi la oameni. Există însă observaţii care, din punct de vedere imunologic, pun sub semnul întrebării posibilitatea de a folosi heterotransplantele hepatice în clinică. Green (173) a transferat ţesuturi embrionare diverse de iepure în camera anterioară a ochiului de cobai şi a observat că toate ţesuturile se dezvoltă în acest mediu, cu excepţia ţesutului hepatic, fapt care ar putea fi considerat fie ca o consecinţă a stimulului antigenic deosebit de puternic produs de acest ţesut, fie ca o consecinţă a excepţionalei sale sensibilităţi la atacul imunologic.

5. SURSE DE ŢESUTURI PENTRU HOMOTRANSPLANTELE LIBERE

Cu excepţia ţesutului hematopoietic şi a pielii, care se pot preleva pentru transplantare de la donatori în viaţă fără a periclita sănătatea acestora, celelalte ţesuturi (os, cartilaj, muşchi, tendon, cornee, nerv şi chiar glande endocrine) este preferabil să se recolteze de la cadavre umane, imediat după moarte. În această situaţie, riscul pierderii viabilităţii este condiţionat de o serie de factori: sensibilitatea ţesutului la lipsa de oxigen, intervalul dintre momentul prelevării şi momentul grefării, necesitatea conservării ţesutului, metoda de conservare etc.

În literatura ultimilor 20 de ani există nenumărate referinţe despre folosirea clinică a acestor ţesuturi, pentru unele dintre ele în formă viabilă (mă-

Scanned with OKEN Scanner

duvă osoasă hematogenă, glande endocrine diverse, mușchi și nervi), iar pentru altele în formă neviabilă (os, cartilaj).

Măduva osoasă hematogenă. Măduva osoasă hematogenă se recoltează în funcție de doza indicată, de la mai mulți donatori. De exemplu, în anemia aplastică, Dameshek și colab. [citați de (543)] au obținut rezultate satisfăcătoare transplantînd fiecărui bolnav 1—2 miliarde de celule colectate de la 8—12 donatori. Așa cum s-a mai arătat, unele cazuri de agammaglobulinemie, mai rar cazurile de leucemie și destul de des cazurile de iradiere accidentală, beneficiază de pe urma unui asemenea homotransplant. Problema heterotransplantării măduvei osoase hematogene nu se discută acum decît la nivelul unor cercetări experimentale pe animale, această preocupare fiind determinată mai curînd de necesitatea elucidării unor aspecte obscure ale imunității de transplantare decît de o cerință clinică imperioasă.

Pielea. În mod cu totul ocazional este disponibil un geamăn identic ca donator de piele în vederea reparării unor defecte tegumentare largi, pentru care autogrefele nu sînt suficiente. Un geamăn neidentic nu este mai indicat ca donator de piele decît alți donatori înrudiți. În lipsa unui donator care exclude incompatibilitatea tisulară, așa cum se întîmplă între gemenii identici, pielea se poate homografa cu riscurile cele mai mici de eliminare numai de la părinți la fii și invers. Homografele de piele de la rude îndepărtate se comportă la fel ca acelea care provin de la donatori neînrudiți cu receptorul și de aceea, din punct de vedere clinic, posibilitatea unor asemenea surse de țesut nu trebuie luată în considerație.

Propunerea de a se folosi la oameni surse multiple de piele pentru homografare se sprijină pe două presupuneri, care, după cum susține Medawar (313), își găsesc sprijin în rezultatele obținute în experiențe pe iepuri și ar putea fi valabile și pentru om: a) viteza cu care se dezvoltă procesul imunologic depinde de cantitatea de piele transplantată sau, cu alte cuvinte, o homografă tegumentară mică supraviețuiește mai mult decît una mare; b) cu toate că o homografă de piele poate face receptorul mai rezistent față de alte grefe omologe, provenind de la animale din specia donatorului, creșterea rezistenței față de aceste homografe de piele este mai mică decît față de homografa prelevată de la același donator. În consecință, dacă se transplantează pielea cu proveniență multiplă la același receptor, rezistența față de o anumită grefă reprezintă suma răspunsului față de o componentă puternică, indus de grefa însăși, și răspunsurile față de numeroase componente reduse, incluse de alte grefe. Astfel, rezistența receptorului față de o singură homografă de piele de origine unică și dimensiuni mari este mai mare decît rezistența sa față de homografe de piele de origini multiple și dimensiuni reduse. McCoy, Sanders și Moore și Mowlem [citați de (543)] au obținut rezultate încurajatoare aplicînd aceste observații în clinică.

Cartilajul. Asupra folosirii clinice a cartilajului neviabil sau a homo- și heterografelor de cartilaj există de asemenea o evidență importantă. Cartilajele cu condrocite distruse prin conservare îndelungată în mertiolat, prin fierbere, prin conservare în formol, după ce au fost prelevate de la cadavre umane, de la bovine, porcine sau alte mamifere, au fost folosite în diverse scopuri

Scanned with OKEN Scanner

clinice de către numeroşi autori. Cartilajul neviabil se stochează cu uşurinţă în cantităţi şi dimensiuni după dorinţă. El îşi pierde tendinţa de distorsiune după secţionare, mai ales dacă a fost fixat în formol sau prin fierbere. După implantare, el persistă fără să se modifice suficient timp, îndreptăţind aprecierile favorabile ale cercetătorilor optimişti. Dar majoritatea implantelor de cartilaj neviabil prezintă semne de resorbţie progresivă, pînă la dispariţie, după 18—24 de luni de la operaţie (159, 379); numai în cazuri foarte rare, implantul de cartilaj neviabil se înconjură de o capsulă asemănătoare unei burse adventiceale şi în această împrejurare poate dura mai mulţi ani (163), dar o asemenea evoluţie nu poate fi prevăzută.

Heterografele de cartilaj neviabil s-au dovedit a fi antigenice. De exemplu, implantele repetate de cartilaj bovin la om sau alte mamifere se resorb din ce în ce mai rapid (159). Acest fapt nu a fost însă observat cînd s-au folosit homografe de cartilaj uman neviabil (99, 158). Din aceste date reiese că folosirea cartilajului neviabil nu are avantaje mai multe decît folosirea materialului plastic inert. Ţinînd seama de observaţiile prezentate în altă secţiune a acestui capitol, în legătură cu homografele de cartilaj viabil, acesta din urmă apare mult mai convenabil pentru utilizarea clinică. În acest caz nu se poate folosi ca sursă decît cadavrul uman, iar transplantarea trebuie făcută cît mai curînd posibil după prelevarea cartilajului, care la rîndul său trebuie să se efectueze imediat după moarte.

Tendonul. Acest ţesut ridică din punctul de vedere al sursei aceleaşi probleme ca şi cartilajul. Chirurgia reparatoare cunoaşte numeroase tentative de transplantare a tendoanelor. Porţiuni din fascia lata au fost utilizate pentru reconstituirea unor tendoane şi, la fel ca în cazul cartilajului, rezultatele cele mai bune au fost obţinute cu ţesut neviabil, conservat în alcool, chiar atunci cînd s-au efectuat heterotransplantări [Nageotte şi Sencert, citaţi de (543)]. Cu toate acestea, majoritatea chirurgilor din toate ţările preferă, în cazul leziunilor cu sancţiune chirurgicală ale tendoanelor, să execute transferări de tendoane (un tendon care aparţine unui muşchi în funcţiune se divide, urmînd ca una dintre diviziunile sale să fie suturată la capătul unui alt tendon sau ancorată la os) sau *tenodesis* (metodă care conferă tendonului o altă inserţie, făcîndu-l să funcţioneze ca un ligament). În tratamentul ortopedic al sechelelor de poliomelită s-au adoptat de cele mai multe ori aceste ultime metode.

Muşchiul. Transferul de muşchi a fost deseori folosit în practica medicală pentru corectarea consecinţelor paraliziei unor muşchi ai membrelor, ai feţei, ai globului ocular sau ai aparatelor sfincteriene. Transplantarea heterotopică a muşchiului a înregistrat doar încercări lipsite de succes, iar transplantele libere de muşchi au fost efectuate în clinică avîndu-se în vedere numai efectul lor hemostatic local. În acest scop au fost folosite chiar homo- şi heterografe [Ingraham şi colab., citaţi de (543)]. Cum pentru asemenea cerinţe clinice cantităţile de ţesut muscular sînt mici, problema sursei de ţesut a avut o importanţă minoră. Efectul hemostatic al grefei libere de muşchi este pus pe seama faptului că ea aderă cu repeziciune la ţesuturile pe care a fost aplicată şi că eliberează tromboplaşti cu mare potenţial funcţional.

Osul. Brooks şi Hudson [citaţi de (543)], lucrînd cu cîini, au obţinut regenerarea completă a unuia dintre oasele lungi, după înlocuirea unei părţi

Scanned with OKEN Scanner

a acestuia cu o homografă. Investigaţii ulterioare pe iepuri şi cîini au confirmat experienţele lor, dar s-a constatat în acelaşi timp că homografele sînt mai puţin sigure decît autografele. De fapt, homografele osoase ca atare nu supravieţuiesc; pe tutorele pe care-l reprezintă stroma osoasă însăşi, organismul gazdei construieşte un os nou, propriu. Heterotransplantele osoase (oase de cîine transplantate la pisică) se încapsulează şi nu stimulează osteogeneza, în timp ce oasele de cornute transplantate la cîini par a înlesni vindecarea defectelor osoase [Gallie şi Robertson, ca şi Hughes, citaţi de (543)]. Homografele ortotopice de os şi uneori chiar heterografele de os, care au fost distruse prin fierbere, conservare în alcool, eter sau mertiolat, ori prin îngheţare şi dezgheţare succesive, stimulează osteogeneza şi sînt încorporate treptat de organismul-gazdă, care repopulează osul transplantat cu celulele sale. Aceasta este concluzia unui număr limitat de cercetări [Gallie şi Robertson; David şi Cristopher; Reynolds şi Olivier; Kreuz şi colab.; Herbert şi Paillot, citaţi de (543)] care au fost infirmate ulterior: grefele osoase neviabile sînt mai puţin avantajoase decît grefele viabile [Imbert, Keith, Stewart, citaţi de (543)].

Importanţa sursei de ţesut osos pentru transplantare trebuie apreciată prin prisma acestor observaţii. În cazurile clinice, care au reclamat transplantarea osoasă s-a recurs fie la donatori multipli, de la care s-au recoltat fragmente osoase mici (din tibia, din osul scapular, din fibula, din oasele falangiene etc.), fără repercusiuni importante asupra sănătăţii lor, fie la fragmente osoase importante prelevate de la cadavre (395). Sursele de ţesut au fost aceleaşi şi în cazul în care pentru repararea unor defecte osoase s-a recurs la os total şi în acelea în care s-au folosit numai homografele de corticală osoasă.

Nervul. Numeroase cazuri de transplantare de nerv, dintre acelea citate în literatura veche, au o valoare mică sau sînt lipsite de valoare pentru stabilirea eficacităţii acestui procedeu şi, ca atare, nu insistăm asupra lor. În această privinţă există informaţii într-o serie de lucrări de amploare (112, 161, 170, 395, 453, 475, 542, 543).

Homografele de nerv, la fel ca şi autografele de nerv, sînt capabile să stabilească legătura între capetele unui nerv secţionat al gazdei şi se pare că degenerescenţa valeriană se produce într-un ritm ceva mai lent în cazul homografelor decît în acela al autografelor; în schimb, infiltraţia limfocitară este incomparabil mai intensă în cele dintîi, în decurs de 10—11 zile de la transplantare. Sursa de nervi pentru homotransplantare la om a fost constituită de membre amputate pentru traumatisme, boli vasculare periferice, tumori etc. Cu toate că numeroase încercări de a homografa nervi periferici nu au adus bolnavilor beneficii deosebite [Sanders, Seddom şi Holmes, Sparling şi colab., Barnes şi colab., Davis şi Ruye, citaţi de (543)], există două motive de optimism în privinţa utilizării acestui procedeu în clinică: a) sursa de nervi pentru transplantare nu ridică probleme speciale; b) grefa de nerv este traversată cu timpul de prelungirile axonice ale nervilor gazdei şi, în consecinţă, dacă se împiedică reacţia imunologică a organismului în acest interval, riscul eliminării sale ulterioare se reduce considerabil.

Corneea. Acest ţesut a ridicat mai multe dificultăţi de conservare şi tehnică de grefare decît de procurare sau histocompatibilitate. Materialul pentru

Scanned with OKEN Scanner

homografe de cornee se prelevează de obicei de la cadavre şi uneori de la bolnavi supuşi ablaţiei unui glob ocular.

Glandele endocrine. Tentativele clinice de a homografa glande endocrine au fost limitate din cauza posibilităţii de substituire a acestora cu preparate endocrine eficace. Atunci cînd s-au efectuat asemenea homografe, sursele au fost de obicei cadavrele umane şi bolnavii supuşi ablaţiei unei glande endocrine. Posibilităţile de heterografare a glandelor endocrine fiind mai largi, nu este exclus ca, după ce vor fi cunoscute mijloace eficace de abrogare a rejecţiei, transplantarea glandelor endocrine să fie preferată tratamentului de substituire cu diverse preparate hormonale, pentru că în menţinerea homeostazei, transplantul endocrin viabil pare mult mai eficace.

C. PRINCIPIILE CONSERVĂRII ORGANELOR ŞI ŢESUTURILOR PENTRU TRANSPLANTARE

Conservarea organelor pentru o perioadă mai lungă nu este posibilă fără afectarea gravă a viabilităţii lor. În funcţie de particularităţile metabolice ale fiecărui organ, conservarea creează diferenţe de comportament funcţional după transplantare. Această situaţie a determinat în ultimii ani numeroase şi interesante încercări de a găsi metodele cele mai adecvate de conservare a organelor pentru transplantare, care să permită folosirea donatorilor ocazionali (cadavrele accidentaţilor, cadavrele bolnavilor decedaţi în spital etc.) pe o scară mai largă.

Cunoştinţele noastre privind efectele diferitelor procedee de conservare a ţesuturilor organizate (tendoane, nervi, cornee, cartilaje) fiind mai numeroase şi mai certe, în cele ce urmează se va insista mai mult asupra problemelor pe care le ridică metodele actuale de conservare a organelor interne pentru transplantare.

CONSERVAREA RINICHIULUI PENTRU TRANSPLANTARE

Consideraţii anatomice. Ross şi colab. (438) au studiat vasele renale la 34 de cadavre din punctul de vedere al convenabilităţii lor de suturare şi au găsit că, la peste 50% din cadavrele examinate, vasele renale sînt neconvenabile pentru acest act chirurgical; numai în 5% din cazuri, ambii rinichi prezintă vase potrivite, în 33% din cazuri rinichiul stîng se află într-o situaţie satisfăcătoare şi în 3% din cazuri rinichiul drept se află într-o asemenea situaţie. Aşadar, rinichiul stîng prezintă cea mai bună alegere în acest scop, lungimea mai mare a venei renale stîngi fiind un amănunt favorizant. În cazul prelevării rinichiului de la donatori în viaţă este indicată în mod obligatoriu angiografia renală pentru alegerea rinichiului în vederea transplantării. Smith şi colab. (477), din studii similare asupra unui număr de 67 de cadavre umane, au ajuns la următoarele concluzii privind tactica chirurgicală pentru eventualitatea existenţei unor anomalii vasculare: a) ligatura unei artere renale anormale duce cu multă probabilitate la ischemia unui teritoriu al parenchimului renal proporţional cu calibrul vasului; astfel, numai dacă vasul anormal este

Scanned with OKEN Scanner

foarte mic se poate renunța la folosirea lui, dat fiind că în acest caz se pot stabili anastomoze vasculare satisfăcătoare la nivelul vaselor mici capsulare sau extracapsulare; b) ligatura unei vene renale anormale nu duce aproape cu certitudine la îngreuierea circulației, pentru că în rinichi există numeroase și largi comunicații veno-venoase; c) cînd se execută ablația unui rinichi pentru transplantare trebuie ca izolarea și secționarea vaselor renale să se facă foarte aproape de aortă și de vena cavă, pentru a nu sacrifica vasele segmentale renale cu originea foarte aproape de emergența vaselor renale principale.

Rinichiul dispune de o mare rezervă funcțională, astfel încît un rinichi infantil, chiar nehipertrofiat, poate asigura depurarea sanguină a unui adult. Totuși, pot interveni unele dificultăți tehnice în transplantarea unui rinichi mic la un adult, la fel cum se pot ivi asemenea dificultăți în transplantarea la copil a unui rinichi prelevat de la adult.

Considerații experimentale. Date fiind dificultățile de a obține rinichii pentru transplantare de la cadavre umane, tipizarea donatorilor este practic imposibilă în afara limitelor compatibilității de grup sanguin. Probabil că în rinichi se produc tulburări ischemice considerabile, pe durata în care el este prelevat, dar din momentul prelevării există posibilitatea de a minimaliza tulburările ulterioare, adică acelea dinaintea efectuării anastomozelor și a reirigării sale în condiții normale de temperatură.

Din experiențe pe cîini cu transplant renal și din observații clinice asupra transplantării rinichiului uman între gemeni identici s-au stabilit cîteva concluzii interesante și anume: a) dacă perioada de ischemie totală este mai mică de o oră, se poate spera într-o funcție renală adecvată imediat după operație, cu anomalii temporare; b) dacă perioada de ischemie totală este de 1—2 ore, probabilitatea producerii unor necroze tubulare de intensități variate nu poate fi ignorată; c) după 3 ore de ischemie totală apar frecvent leziuni ireversibile, care fac ca funcția rinichiului să se reducă sub posibilitatea de a menține viața receptorului.

În cursul transplantării sale, rinichiul, o dată prelevat de la donator, își pierde treptat căldura, apropiindu-se de temperatura camerei. Dacă un rinichi ischemic este păstrat la temperatura camerei, intensitatea leziunilor tubulare este mai mare.

Folosindu-se răcirea simplă, de suprafață, cu gheață, a rinichiului de cîine (216, 319) și reimplantarea sa ulterioară în organismul de origine, s-a constatat că chiar după 12 ore de păstrare a organului în aceste condiții, rinichiul este în stare să reziste efortului funcțional sever, implicat de nefrectomia contralaterală imediată; păstrarea la temperaturi joase a rinichiului între 12 și 17 ore este urmată de leziuni uneori parțial reversibile, însă după 24 de ore de conservare se produc leziuni grave, total ireversibile (75).

Comportarea în timp a rinichiului transplantat după conservare nu este cunoscută suficient în prezent, dar există oarecare date potrivit cărora nu se produce o deteriorare progresivă a funcției renale în intervalul pînă la 1 an de la transplantare.

Perioada de răcire poate fi redusă prin perfuzarea rinichiului (220, 221), care își găsește aplicare mai ales în condițiile folosirii rinichilor umani de la cadavre, dat fiind că în aceste cazuri este obligatorie prelungirea intervalului

Scanned with OKEN Scanner

dintre încetarea irigării şi transplantarea lor şi că, rinichiul uman fiind mai mare, răcirea de suprafaţă se face mai lent decît la rinichiul de cîine. Răcirea rinichiului prin perfuzie pînă la temperatura de aproximativ +15°, urmată de păstrarea sa în gheaţă, a fost studiată pe rinichi de cîine de către Pegg şi colab. (398). Utilizarea perfuziei cu sînge rece pentru răcirea rinichiului a permis efectuarea unor autotransplante renale, care au menţinut animalele în viaţă chiar după o perioadă de 24 de ore de conservare la +1° (71). Investigaţia funcţiilor rinichiului conservat prin răcire, folosind testele cu insulină şi fitohemaglutinine a demonstrat că perioada de ischemie renală sub 24 de ore este compatibilă cu reluarea satisfăcătoare a funcţiilor renale, pentru o perioadă de timp de 5—14 luni după autotransplantare. Humphries şi colab. (221) au încercat să mărească timpul de conservare a rinichiului, cu rezultate încurajatoare. Trei rinichi de cîine prelevaţi şi conservaţi *in vitro*, prin perfuzie la 4—14° cu plasmă diluată şi oxigenată la o presiune de perfuzie de 33 mm Hg, s-au dovedit a asigura viaţa animalului respectiv chiar după 2 ani de la reimplantare, nefrectomia contralaterală efectuîndu-se la 3 săptămîni după autotransplantare. Este adevărat că procentul de supravieţuire a fost mic (3 rinichi din 63 de încercări), dar aceste experienţe reuşite au constituit premisa unor încercări ulterioare cu metode îmbunătăţite şi cu rezultate surprinzătoare, procentul de supravieţuire fiind de 5 din 7 cîini cu nefrectomie contralaterală la 3 săptămîni după autotransplantare (219) şi de 8 din 11 cîini cu nefrectomie contralaterală concomitentă cu autotransplantarea (220) pentru o perioadă de 24 de ore de conservare *in vitro* a rinichiului. Pînă în prezent, ultima metodă de conservare, prezentată de Humphries şi colab. (220), pare a fi cea mai eficientă. Au reuşit de asemenea să conserve rinichiul *in vitro* timp de 22—28 de ore înainte de autotransplantare şi alţi autori (265, 472), dar metodele utilizate nu au permis ca nefrectomia contralaterală să se execute decît după cîteva săptămîni sau luni. Calne şi colab. (75) au combinat cu succes nefrectomia contralaterală imediată, cu autotransplantarea rinichiului după 12 ore de conservare.

Avantajele metodelor actuale de conservare a rinichiului pentru transplantare constau în folosirea unor soluţii „de echilibru" pentru diluţia sîngelui sau plasmei cu care urmează a se perfuza organul, a unor presiuni mai mari de perfuzie şi a unor dispozitive perfecţionate.

Soluţiile cu care se diluează plasma sau sîngele pentru perfuzie au o compoziţie (tabelul 6) care le conferă un vădit caracter de soluţii-tampon (78, 220). Sîngele diluat este preferabil pentru perfuzie şi se pare că acest fapt nu se datoreşte numai capacităţii sale de a transporta oxigenul (220, 340).

Presiunea de perfuzie de 40 mm Hg, nu mult sub presiunea sanguină a unor oameni normali în cursul somnului (431), asigură un debit renal convenabil. Presiunile normale nu pot fi folosite, fiindcă duc la edem interstiţial şi, mai ales, la hiperhidratare celulară şi astfel la reducerea progresivă a fluxului sanguin (plasmatic) în organul perfuzat (295).

Rinichii umani recoltaţi de la cadavre, în general afectaţi de tulburările patologice care au dus la moarte, se conservă cu multă dificultate (295) şi este necesar să se ţină seama de acest fapt înainte de a se omologa rezultatele obţinute pe rinichii de cîine normal cu ceea ce se poate întîmpla la om în condiţii asemănătoare.

Scanned with OKEN Scanner

Era de aşteptat ca, reducînd metabolismul unui organ prin răcire, el să devină mai apt de a rezista unor perioade mai lungi de ischemie ; consumul de oxigen scade exponenţial cu scăderea temperaturii (460), atingînd nivelul cel mai scăzut la temperaturi cuprinse între 0 şi 1° (148). S-a încercat con-

Tabelul 6

Compoziţia soluţiei saline „de echilibru" folosită pentru diluţia plasmei de conservare *in vitro* a rinichilor, în comparaţie cu plasma normală de cîine

Componentul	Concentraţia	Soluţia salină	1 000 ml soluţie salină „de echilibru" + 27 mEq $NaHCO_3$	Plasmă de cîine *
Sodiu	mEq/l	138	160	150
Potasiu	mEq/l	6	6	4,4
Magneziu	mEq/l	2	2	1,8
Calciu	mEq/l	0	0	5,3
Cloruri	mEq/l	142	138	106
Sulfaţi	mEq/l	2	2	2
Fosfaţi	mEq/l	2	2	1,8
Bicarbonat	mEq/l	0	26	20,5
Glucoză	mg/100 ml	100	97	60

* În plasma cîinelui, totalul anionilor echilibrează totalul cationilor, prin prezenţa acizilor organici şi a anionilor proteici (după Humphries şi colab.) (220)

servarea rinichilor de mamifere sub 0°, dar tulburările produse de îngheţare şi de introducerea şi înlăturarea soluţiilor protectoare sînt atît de mari încît este îndoielnic dacă în această direcţie vor fi posibile progrese substanţiale în viitorul apropiat (475). Calne şi colab. (73) şi Pegg şi colab. (398) au

Fig. 24. — Glomeruli normali la 71 de zile după autotransplantare renală (hematoxilină-eozină, × 450) [după Pegg şi colab. (398)].

Scanned with OKEN Scanner

recurs la imersarea rinichiului în lichid provenit din culturi de țesuturi, răcit la 4°, pentru al putea conserva cel puțin 12 ore, fără să se producă alterarea sa funcțională ireversibilă. În figura 24 este ilustrată starea unui rinichi — conservat prin perfuzie cu sînge autolog rece timp de 24 ore — la 71 de

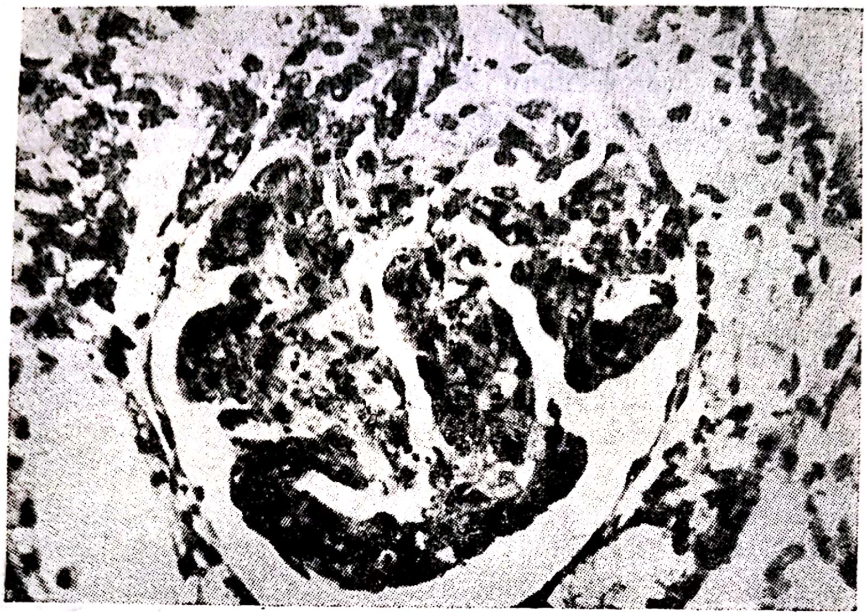


Fig. 25. — Stadiu final de scleroză glomerulară după autotransplantarea rinichiului perfuzat în prealabil cu Rheomacrodex (hematoxilină-eozină, × 450) [după Pegg și colab. (398)].

zile după autotransplantare. Pegg și colab. (398) sînt de părere că durata răcirii *per se* nu este importantă pentru conservare, dar că tehnica de răcire are o importanță deosebită și se pronunță în favoarea perfuziei cu sînge rece, diluat cu soluții adecvate din punct de vedere metabolic și bine oxigenat.

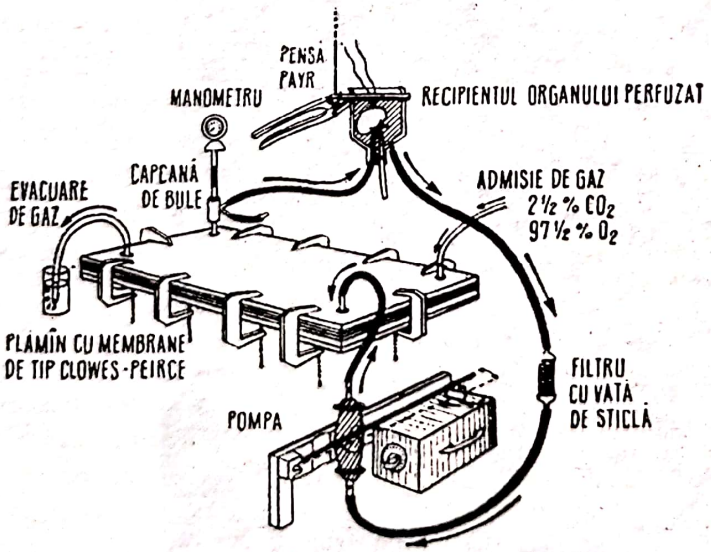


Fig. 26. — Dispozitiv de perfuzie a organelor izolate *in vitro* pentru conservare, în vederea transplantării [după Humphries și colab. (220)].

Perfuzia cu substituenți sanguini ai rinichiului determină leziuni glomerulare, care nu se produc în alte condiții de conservare. Diluția sîngelui cu asemenea substanțe duce la rezultate similare. În figura 25 sînt ilustrate degenerarea hialină și scleroza glomerulară (385), consecutive conservării unor rinichi de cîine prin perfuzie cu Rheomacrodex (156). Se pare că soluțiile hiperosmotice sînt mai potrivite decît soluțiile coloidale pentru substituirea sîngelui în lichidul de perfuzie a unor organe hipoxice (73, 398).

Scanned with OKEN Scanner

Sistemul de perfuzie utilizat de Humphries şi colab. (219, 220) este constituit dintr-un circuit extracorporeal închis, prevăzut cu un plămîn cu membrane de tip Clowes-Peirce şi un filtru de vată de sticlă Pyrex de tip Swank (50) şi este plasat într-un refrigerator la +10° (fig. 26). Leziunile

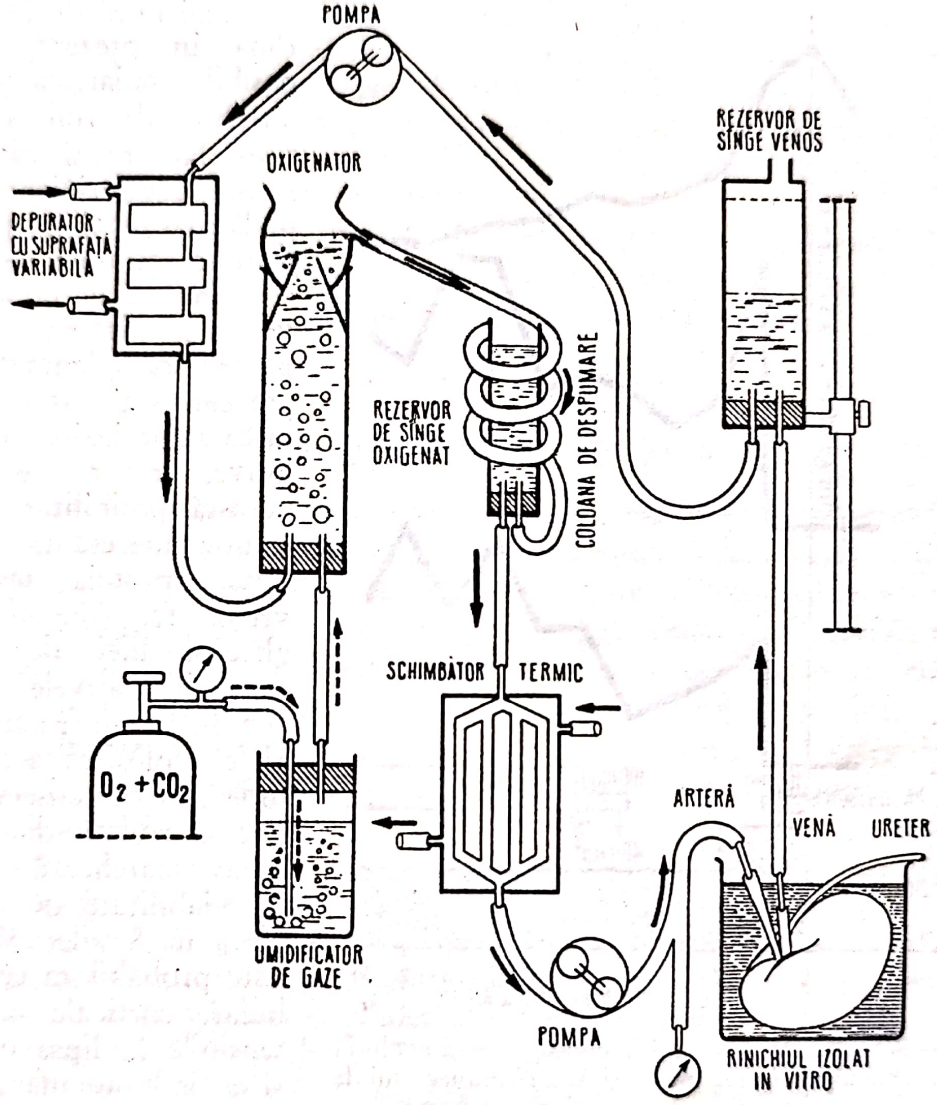


Fig. 27. — Dispozitiv de perfuzie a organelor izolate *in vitro*, prevăzut cu un depurator de dimensiuni mici cu suprafaţă activă variabilă (date personale).

ischemice renale care apar după folosirea acestui dispozitiv de perfuzie sînt minime, permiţînd astfel efectuarea nefrectomiei contralaterale imediat după reimplantarea organului conservat. Un sistem de perfuzie asemănător, prevăzut de asemenea cu un depurator, se utilizează şi în laboratoarele noastre de cercetări experimentale (fig. 27). Aceste sisteme de perfuzii reprezintă o ameliorare substanţială a altor tehnici de conservare a rinichilor pentru transplantare (75, 265, 472).

Scanned with OKEN Scanner

În cazul tuturor metodelor folosite pînă acum se pare că se produc leziuni progresive în rinichi şi cu atît mai mult atunci cînd el este perfuzat la temperatura normală sau cînd este păstrat la aproximativ 0°, astfel încît s-au obţinut supravieţuiri ale receptorului după transplantare numai dacă perioada de conservare a fost mai mică de 24 de ore. Pînă în prezent nu este posibil, aşadar, să se creeze un stoc de rinichi pentru transplantare şi nici să se conserve un rinichi o perioadă mai lungă de timp, aşa cum se întîmplă cu sîngele.

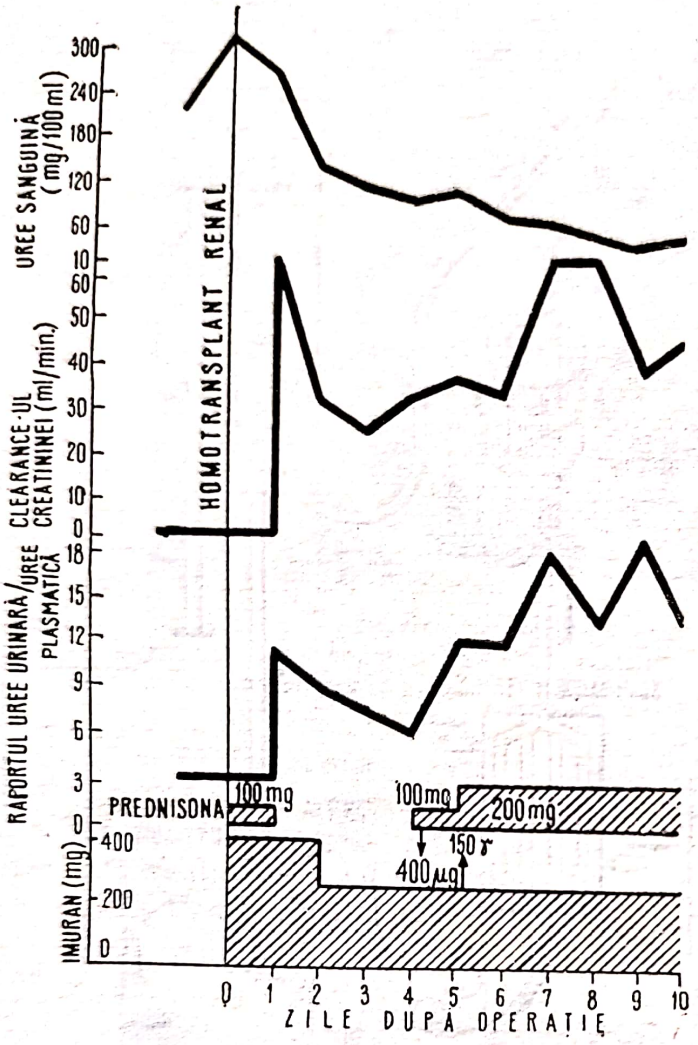


Fig. 28. — Schema tratamentului imunosupresor şi evoluţia raportului uree urinară/uree plasmatică, a *clearance*-ului de creatinină şi a ureei sanguine la un bolnav cu homotransplant de rinichi, prelevat de la cadavru şi conservat prin perfuzie cu soluţie Ringer rece, conţinînd albumină [după Calne (71)].

Încercările de a conserva prin îngheţare rinichii pentru transplantare au dus, aşa cum s-a arătat, la instalarea unor leziuni ischemice grave, ireversibile. Totuşi, această posibilitate ar fi o soluţie interesantă dacă s-ar putea proteja ţesutul în vreun fel (dimetilsulfoxid, glicerol, ulei de parafină etc.). Tentativele de acest gen au fost infructuoase. De altfel, folosirea acestor metode pentru conservarea celulelor izolate din măduva osoasă marchează o pierdere de viabilitate de cel puţin 20% în 8 zile (396, 397). Este probabil ca celulele tubulare corticale să fie mai sensibile la lipsa oxigenului şi să fie lezate mai grav prin conservare la temperaturi sub 0°.

S-au obţinut rezultate excelente după răcirea rinichilor umani prin perfuzie cu o soluţie Ringer conţinînd albumină serică umană (12,5 g/l) (fig. 28) sau, potrivit experienţei noastre, cu o soluţie Ringer conţinînd polivinilpirolidonă (10—15 g/l).

Baitz şi colab. (11) au încercat să prelungească timpul de conservare a rinichiului pentru transplantare, supunîndu-l simultan răcirii şi oxigenului sub presiune (4 atmosfere), dar n-au obţinut rezultate deosebite.

Transplantul renal „în derivaţie". Hume şi colab. (218) au experimentat la cîine o tehnică pentru studiul homografelor renale, menţinute o scurtă

perioadă de timp în *shunt* arterio-venos semipermanent. Asemenea rinichi transplantaţi ulterior au funcţionat bine. Rinichiul de testat se canulează, se perfuzează cu o soluţie fiziologică răcită pentru a-l conserva şi se plasează într-un sac de material plastic steril, care se închide. El poate fi stocat într-un recipient conţinînd soluţie fiziologică rece pînă în momentul folosirii, cînd cele două canule din vena şi artera renală sînt conectate la un *shunt* arterio-venos al unui membru al „receptorului". O canulă introdusă în ureter permite scurgerea urinii şi măsurarea debitului urinar. Această tehnică permite observarea minut cu minut, timp de cîteva ore, a funcţiei rinichiului şi a modificării structurii sale (biopsii repetate). Rinichiul poate fi deconectat din cînd în cînd şi reintrodus în recipientul de răcire.

Această tehnică pare a avea două indicaţii practice: prima ar fi posibilitatea de a se efectua dializa organismului la care se conectează rinichiul, iar cea de a doua ar fi posibilitatea studiilor biologice, mai ales în cazul heterotransplantelor renale.

CONSERVAREA INIMII PENTRU TRANSPLANTARE

Dintre obstacolele care stau astăzi în calea perfectării transplantării clinice a inimii, conservarea extracorporeală a acesteia este, poate, mai importantă decît sursa, cu toate că acest organ este unic. Această afirmaţie este cu atît mai îndreptăţită, cu cît din punct de vedere chirurgical grefarea este o operaţie fără dificultăţi, iar efectele denervării s-au dovedit a fi temporare. Asigurarea viabilităţii miocardului după hipoxie prelungită rămîne, aşadar o problemă principală. Pentru a ilustra importanţa critică a acestei probleme trebuie menţionată şi discordanţa dintre necesitate şi posibilităţile de a procura grefe cardiace.

În scopul de a evita consecinţele hipoxiei asupra miocardului între momentul prelevării şi momentul transplantării, Shumway şi colab. (465) şi Webb şi colab. (530) au recurs la stopul cardiac hipotermic, care, în condiţii de uniformizare ulterioară a temperaturii, face posibilă conservarea grefei de inimă pentru o oră. Adaptarea clinică a răcirii locale a inimii a dat rezultate bune în chirurgia pe inima deschisă, chiar pentru o perioadă de stop cardiac efectiv de 2 ore. Evidenţa experimentală şi clinică actuală face din răcirea locală a inimii, prin procedee variate, modalitatea preferată de protecţie a transplantului de inimă, în cursul anoxiei obligatorii dintre momentul prelevării sale de la donator şi momentul transplantării sale. În figura 29 sînt redate cîteva din înregistrările activităţii electrice a inimii canine homotransplantate, după un stop circulator hipotermic de durată variabilă. Temperatura miocardului poate fi coborîtă la 10°, prin imersare totală în ser fiziologic răcit la 2° timp de 15 minute şi poate fi menţinută la nivelul de 5—10° pînă în momentul transplantării. Utilizînd exclusiv această metodă, Lower şi colab. (285) au reuşit să efectueze homotransplantarea inimii la cîine după 7 ore de anoxie. În aceste condiţii, însă, homotransplantul cardiac nu poate asigura funcţia circulatorie după 12 ore de anoxie şi nu poate fi resuscitat din fibrilaţie ventriculară după 24 de ore de conservare *in vitro* (464).

Scanned with OKEN Scanner

CÎINELE Nr. 1

HOMOTRANSPLANT

CÎINELE Nr. 3

CARDIAC

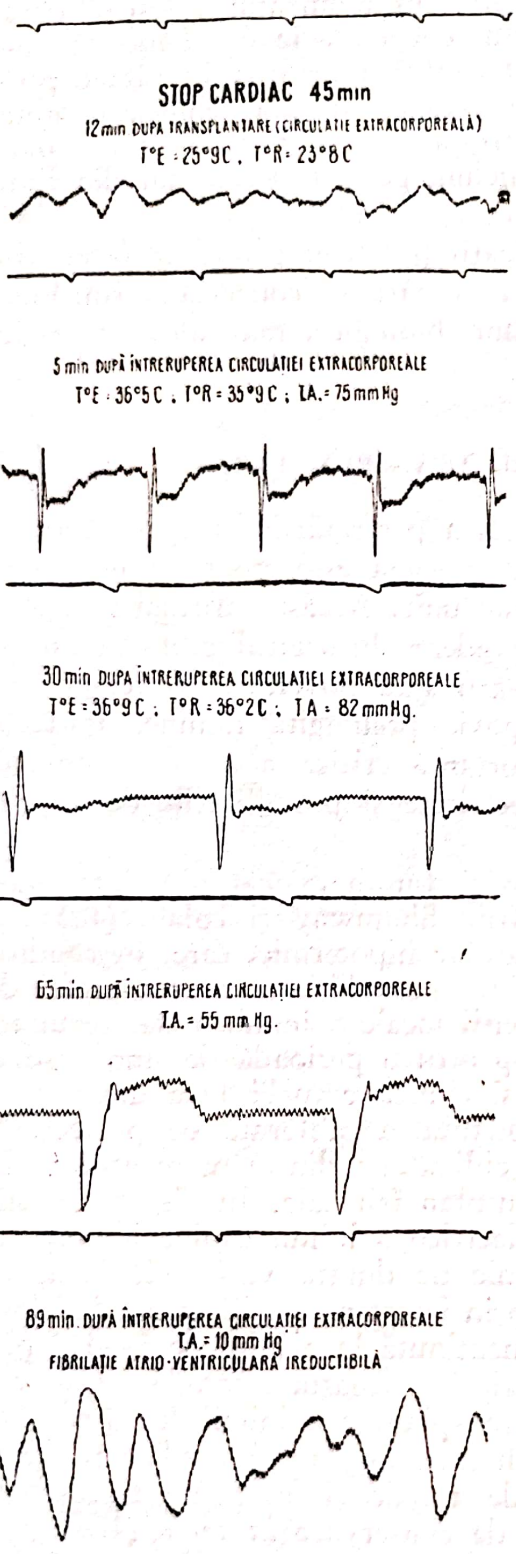


Fig. 29. — Activitatea electrică postoperatorie a homotransplantului cardiac ortotopic la cîine (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

Combinația dintre refrigerarea locală și perfuzia coronariană a dat rezultate slabe la cîine și rezultate încurajatoare la viței (194). Dintre metodele de perfuzie coronariană, perfuzia retrogradă, prin sinusul carotidian, cu sînge răcit și oxigenat, folosind debite sanguine și presiuni reduse, s-a dovedit mai eficace decît perfuzia prin artera coronară; calea sinusului coronar permite folosirea unui singur cateter și efectuarea unei incizii aortice mai lungi, care ușurează executarea anastomozelor aortice (194). Dacă volumul perfuziei coronariene se apropie de valorile normale, inima, chiar răcită, se contractă ritmic sau fibrilează și, ca urmare, consumul de oxigen al miocardului crește.

În prezent se fac încercări de a se conserva grefa de inimă în condiții hiperbarice. Teoretic, această metodă ar prezenta avantaje, dar nu există încă suficiente date practice care să le confirme.

Foarte interesantă pare a fi observația lui Eyal și colab. (132) cu privire la utilizarea clorpromazinei în conservarea grefei de inimă. Ei au perfuzat inimi de cîine pe toată durata activității lor contractile după excizie, folosind 200 ml dextran micromolecular 5% în soluție salină răcită, care a conținut cîte 20 mg heparină și clorpromazină. Organele au fost apoi introduse în aceeași soluție și păstrate astfel 24—96 de ore, după care au fost transplantate heterotopic. Inimile tratate astfel și-au reluat activitatea cu forță și ritm satisfăcător, dacă durata conservării nu a depășit 48 de ore. Acest fapt nu a fost semnalat cînd conservarea s-a făcut numai prin frig. Asocierea oxigenului sub presiune (3—7,9 atmosfere) la un tratament de conservare cu clorpromazină s-a dovedit a îmbunătăți tonusul și ritmul inimii. Rezultatele menționate mai sus sînt puse pe seama acțiunii inhibitorii a clorpromazinei asupra metabolismului celular și a efectului său de stabilizare a permeabilității membranelor celulare și subcelulare.

CONSERVAREA PLĂMÎNULUI PENTRU TRANSPLANTARE

Pentru conservarea plămînului, pe durata de la prelevare la transplantare, a fost recomandată fie perfuzia pe calea arterei pulmonare cu o soluție de dextran micromolecular heparinată și refrigerată (372), fie simpla imersie în soluție Ringer rece, cu precauția ca aceasta să nu pătrundă în sistemul bronșic al grefei (292). Cu ajutorul ambelor metode, conservarea plămînului nu poate fi prelungită decît cîteva ore.

CONSERVAREA FICATULUI PENTRU TRANSPLANTARE

Hipotermia, asociată cu perfuzia ficatului *in vitro*, reprezintă de asemenea metoda uzuală de conservare a acestui organ pentru transplantare. Redăm, după Starzl și colab. (486), momentele importante ale acestui procedeu: 1) prelevarea ficatului de la donator se execută în condiții de hipotermie (30—32°) a întregului organism; 2) în momentul în care circulația arterială hepatică se întrerupe, începe perfuzia organului prin vena portă, folosind o soluție Ringer rece (10—15°), care conține lactat; 3) perfuzia de refrigerare a ficatului se menține pe toată durata dintre prelevarea și transplantarea organului, care nu trebuie să depășească 1—2 ore.

Scanned with OKEN Scanner

CONSERVAREA SPLINEI PENTRU TRANSPLANTARE

În homotransplantarea splinei la cîini, donatorii se supun hipotermiei la 30—32° înainte de prelevarea organului. Perfuzia splinei cu soluţie Ringer-lactat răcită este de asemenea recomandată pe toată perioada dintre prelevare şi transplantare (297).

CONSERVAREA PIELII PENTRU TRANSPLANTARE

Pielea umană poate fi conservată pentru a putea fi folosită după un timp ca auto- sau homografă.

Conservarea pentru autografare. Această operaţie este indicată în eventualitatea că patul de grefare trebuie supus în prealabil unor tratamente antiinflamatoare, cum este cazul arşilor, sau cînd acest pat reclamă conservarea autografei, cum este cazul suprafeţelor de grefare granulate. Pe suprafeţele granulate, autografele conservate de piele dau o proporţie mai mare de adeziune, în comparaţie cu autografele de piele proaspătă (543).

Conservarea pentru homografare. Conservarea pielii în acest scop este valoroasă în măsura în care ea permite în orice moment „acoperirea" temporară a bolnavilor cu plăgi tegumentare întinse, la care autografarea este imposibilă. De asemenea homografele tegumentare conservate pot fi folosite în vederea unui tratament preparator a patului de grefare, care nu este apt pentru o autografare în condiţii de securitate (de exemplu, cînd riscul unei infecţii care ar compromite supravieţuirea autografei este prea mare).

Metodele propuse pentru conservarea şi stocarea pielii sînt numeroase, dar nu se vor prezenta decît acelea care au intrat în uz clinic pe o scară largă.

Conservarea de scurtă durată a pielii. Cînd pielea nu se păstrează mai mult de 3 săptămîni este convenabil să se conserve în cutii speciale (după ce au fost împachetate în comprese înmuiate în soluţii saline), într-un frigider la 1—6°. S-a recomandat de asemenea conservarea, în aceleaşi condiţii, a fragmentelor de piele în ser sanguin, dar acest procedeu măreşte riscul contaminării [Mathews, Flatt, Hanks şi Wallace, Marrangani, citaţi de (543)].

Conservarea de lungă durată a pielii. În acest caz este recomandabil un procedeu mai complex: după ce se ţine fragmentul într-o soluţie salină cu glicerol, timp de 30 de minute, se plasează între două comprese sterile într-un tub steril de sticlă Pyrex, care se răceşte treptat, şi este ţinut apoi într-o masă solidă de bioxid de carbon. Această metodă permite conservarea pielii de iepure peste 1 an şi dă rezultate excelente cînd este aplicată la om (543). Îngheţarea grefelor de piele fără folosirea glicerolului sau a altor substanţe cu acţiune similară nu este satisfăcătoare.

CONSERVAREA CARTILAJULUI PENTRU TRANSPLANTARE

Cartilajul prelevat de la cadavru imediat după moarte este viabil, acest fapt fiind demonstrat de captarea sulfatului-^{35}S *in vitro* şi îşi păstrează activitatea metabolică cîteva săptămîni, dacă este păstrat la +4° (103, 158). Studii cantitative, folosind sulfat-^{35}S sau o coloraţie intravitală, au arătat că această activitate metabolică se deprimă rapid în cursul primelor zile de con-

Scanned with OKEN Scanner

servare şi că, ulterior, acest declin este mai lent, dar nivelul metabolic este foarte scăzut (176—179). După transplantare, celulele cartilajului îşi recapătă numai o parte din activitatea metabolică originară, această recuperare fiind invers proporţională cu durata conservării. Cînd cartilajul se conservă sub 0°, condrocitele cartilajului embrionar (35, 206) sau adult (103, 551) mor şi acest lucru se întîmplă chiar dacă răcirea se face după suspendarea lor în glicerol (157). Recent, Braid şi colab. (55) au evaluat efectele temperaturii sub 0° şi ale unor lichide de protecţie asupra viabilităţii celulelor din cartilajul costal uman şi au ajuns la concluzia că substanţele aditive (glicerol, polivinilpirolidona) prezintă un grad însemnat de toxicitate pentru aceste celule, condiţionat atît de concentraţia substanţei, cît şi de nivelul termic. Acest efect este surprinzător, pentru că în cazul altor ţesuturi (38, 83, 248, 282, 405, 429, 430, 452, 474, 499, 513), conservarea prin îngheţare nu este posibilă fără substanţe aditive de protecţie.

O metodă sigură de conservare a cartilajului pentru transplantare o perioadă mai lungă de timp nu a fost găsită încă şi, ca atare, transplantarea acestui ţesut trebuie făcută cît mai curînd posibil după prelevarea sa de la donator.

CONSERVAREA NERVILOR PENTRU TRANSPLANTARE

Au fost propuse pentru conservarea homografelor nervoase următoarele procedee: a) conservarea în soluţie salină 0,9% la 37°; b) conservarea în soluţie salină 0,9%, soluţie Ringer sau un mediu petrolat la temperaturi joase; c) conservarea cu ajutorul unor substanţe chimice; d) conservarea la temperatura camerei după uscare prin îngheţare.

Fragmentele nervoase conservate în soluţie salină 0,9% la 37° rămîn viabile 3 săptămîni şi se „reinervează" după transplantare. De asemenea, homografele nervoase de cîine se „reinervează" după păstrare cîteva zile la gheaţă sau după conservare în mediu petrolat sau în soluţie Ringer cîteva săptămîni la 2° [Dujarier şi François, Sanders şi Young, Gutmann şi Sanders, citaţi de (543)]. Rezultate excelente au fost obţinute la oameni prin conservarea homografelor nervoase în alcool, soluţie de formol 5—20% sau soluţii de glucoză şi glicerofosfat de sodiu [Fisher, Popper-Grashchenkov, Klemme şi colab., Seddon, Sanders, Schabadasch, citaţi de (543)].

Indiferent de metoda de conservare a homografelor nervoase se pare că atît histologic, cît şi funcţional, utilizarea fragmentelor de nerv conservat pentru transplantare este mai favorabilă decît utilizarea homografelor nervoase imediat după prelevare, neconservate. Reacţia limfocitară fiind mai slabă în primul caz decît în cel de al doilea demonstrează că metodele de conservare mai sus menţionate reduc şi puterea antigenică a homografei nervoase.

În clinică nu s-au folosit încă homografe nervoase conservate prin îngheţare-uscare.

Scanned with OKEN Scanner

În conservarea şi sterilizarea fragmentelor osoase pentru transplantare s-au folosit, în general, aceleaşi metode ca şi în cazul nervului: a) conservare la gheaţă; b) congelare; c) conservare la temperatura camerei după uscare-îngheţare; d) conservare în soluţii antiseptice; e) sterilizare prin fierbere; f) prepararea de *os purum* şi *os novum*. Astfel, transplantele osoase au fost păstrate în mediu petrolat la 4—5°, în sînge citratat la 2—5° şi în sînge diluat cu soluţie salină la aceeaşi temperatură. De asemenea, s-au conservat fragmente osoase prin congelare la —10 şi —20° F [Wilson; Bush şi Garber; Lipscomb; Converse şi Campbell; Stuck şi Dandrige; Sicart şi Binet; Capurro şi Pedemonte, citaţi de (543)], prin uscare-îngheţare [Hyatt; Kreuz şi colab.; Hyatt şi Nutler, citaţi de (543)], prin introducerea în soluţii antiseptice, ca soluţie de mertiolat 1/5 000—1/1 000 sau eter [Reynolds şi Oliver; Harmon; Gordon şi Welsh; Nisber şi Ellis, citaţi de (543)] şi prin fierbere [Kausch; Leriche; Gallie şi Robertson; Loyd-Roberts; Henderson, citaţi de (543)].

Os purum se obţine prin tratarea osului cu hidroxid de potasiu la cald; un astfel de os, introdus sub periostul tibiei receptorului înainte de transplantare, devine *os novum*, ceea ce înseamnă că matricea sa a fost invadată de ţesuturile acestuia şi poate fi transplantat ulterior la acelaşi receptor, cu riscuri mai mici de eliminare. De fapt, acest tratament transformă fragmentul osos într-un os anorganic [Orell; Hoff; Goff; Maatz şi Bauermeister; Hurtey, Boyne şi Losee, citaţi de (543)].

CONSERVAREA CORNEEI PENTRU TRANSPLANTARE

Cu succesul din 1906 al lui Zirm [citat de (445)], care pentru prima dată a efectuat o homografare de cornee la om, urmată de restaurarea vederii pentru o perioadă de 2 ani, s-a ridicat problema surselor de cornee şi a mijloacelor de conservare a acestui ţesut pentru transplantare. Lucrări de pionierat în acest domeniu au publicat Thomas (509), Filatov (138, 139), Bürki (67) şi Paufique şi colab. (391).

În funcţie de împrejurările clinice se poate face o conservare de durată scurtă sau o conservare de durată lungă a grefelor de cornee.

Conservarea de scurtă durată a corneei. Făcînd abstracţie de autografele de cornee, care se practică în condiţii cu totul deosebite şi nu ridică probleme de conservare, materialul cel mai potrivit pentru homotransplantare ar fi corneea proaspătă, folosită imediat după prelevarea sa de la donator. Pentru a realiza acest deziderat, operaţia reclamă o foarte bună organizare, două săli de operaţie şi două echipe de operatori şi oarecare şansă; în condiţiile actuale, acest fel de operaţie este numai uneori posibilă. De aceea s-a recurs la stocarea materialului furnizat de ablaţii oculare pentru neoplasm intraocular, traumatisme care n-au interesat corneea (surse mai puţin recomandabile), sau a materialului prelevat de la cadavre (sursa preferabilă).

Metodele de stocare a acestui material pentru scurtă durată folosesc fie atmosfera cu vapori de apă şi temperatura de +4° (138), fie parafina lichidă şi aceeaşi temperatură (67). Cu ajutorul acestor metode, controlul infectării este incert, iar posibilităţile de conservare nu depăşesc o săptămînă. S-a socotit

Scanned with OKEN Scanner

că cea dintîi dintre metode reduce antigenicitatea ţesutului şi suprimă infecţia (139), în timp ce a doua nu permite folosirea antibioticelor în soluţie şi provoacă dificultăţi tehnice în grefare prin aderenţa uleiului la grefă (445), ceea ce a făcut ca metoda lui Filatov (138) să aibă în prezent mai mulţi adepţi. În general, această metodă a fost completată de la caz la caz cu tratament antibiotic al materialului fie înainte, fie după stocare [imersarea sa timp de 15 minute într-o soluţie de 0,25% soframicină înainte de grefare (445)], dar şi cu această completare, perioada optimă de conservare a rămas tot de 4 zile. De altfel, grefele de cornee stocate o perioadă de timp scurtă dau rezultate mai bune decît acelea conservate cu ajutorul altor metode.

Conservarea de durată lungă a corneei. Dacă o homografă urmează a servi la reconstituirea globului ocular sau pentru tratamentul anumitor boli oculare, circumstanţe în care ţesutul grefat nu este decît un tutore pentru ţesuturile autohtone şi ca atare nu trebuie să fie viabil ci numai steril, se folosesc diverse metode de conservare care să îndeplinească aceste condiţii.

De exemplu, King (247) conservă corneea la temperatura camerei în glicerol 95%, Payran şi colab. (392) folosesc desicaţia, grefele uscate fiind reconstituite cu apă înainte de operaţie, Polge şi colab. (405) şi Eastcott şi colab. (128) stochează acest material la —79°, sub protecţia glicerolului 15%, iar Smith şi colab. (476) recomandă înlocuirea glicerolului cu dimetilsulfoxid.

Fiecare dintre variantele de mai sus prezintă avantaje şi dezavantaje. Astfel, Eastcott şi colab. (128) susţin că metoda lui Polge şi colab. (405), pe care ei au îmbunătăţit-o, este deplin satisfăcătoare pentru grefe de grosime parţială şi că, deşi s-au înregistrat unele insuccese, este posibil ca prin această metodă să se asigure transparenţa absolută chiar şi grefelor de cornee cu grosime completă. Billingham şi Rycroft (40) şi Rycroft (445) care au folosit această metodă, confirmă acest avantaj, care n-o face însă superioară metodei grefei proaspete de cornee. Iliff şi colab. (224) au utilizat glicerol salin (15%), cu rezultate asemănătoare. Cu toate acestea, Smith şi colab. (476) au substituit glicerolul cu dimetilsulfoxid, pretinzînd că cel dintîi nu pătrunde în toată grosimea corneei şi că nu protejează celulele endoteliale faţă de îngheţare şi desgheţare, pe cînd cel de-al doilea, injectat în camera anterioară a ochiului, are o acţiune protectoare mai puternică faţă de aceste variaţii mari de temperatură. Müller şi colab. (353) au modificat totuşi metoda lui Eastcott şi colab. (128), prin aceea că, după injectarea soluţiei de dimetilsulfoxid 7—5% în camera anterioară a globului ocular de la donator, îl conservă prin imersare în glicerol 10% la —79°, obţinînd astfel rezultate satisfăcătoare.

Unele dintre aceste metode nu au depăşit stadiul experimental şi nu este exclus ca pînă în momentul în care se vor transfera în practica chirurgicală normală, ele să sufere alte modificări.

CONSERVAREA VASELOR SANGUINE PENTRU TRANSPLANTARE

În acest scop s-a folosit fie simpla răcire la 2—5°, care permite păstrarea fragmentelor vasculare 10—14 zile, în condiţii bune, fie îngheţarea acestor fragmente, fie imersarea în formol, fie, în sfîrşit, liofilizarea lor [Carrel; Levin şi Larkin; Guthrie, citaţi de (543)].

Scanned with OKEN Scanner

Metodele de prevenire a eliminării organelor homo- sau heterotransplantate. Efectele unor metode utilizate astăzi în studiile experimentale şi tentativele clinice de homo- sau heterotransplantare a ţesuturilor (iradierea totală şi/sau locală a organismului, administrarea unor substanţe imunosupresoare, administrarea serurilor antilimfocitare, depleţia limfocitară prin fistulizarea canalului toracic, splenectomia şi timectomia) asupra supravieţuirii acestor ţesuturi şi organe constituie preocuparea majoră a multor cercetători. Studiile privind aceste efecte se fac paralel cu investigaţii similare asupra homo- sau heterotransplantelor independente, însă numeroase rezultate obţinute, în special acelea privind antimetaboliţii (68, 559), nu sînt comune ambelor tipuri de transplant; în general, aceste substanţe au un efect mai puţin spectacular asupra homo- şi heterotransplantelor cu anastomozele vasculare corespunzătoare. Un fapt de mare interes, demonstrat pe homotransplante la cîine şi om, este acela că procesul de eliminare poate fi oprit sau chiar înlăturat, cel puţin temporar, printr-o serie de procedee fizice, biologice şi farmacologice, care, deşi nu sînt total eficace (2, 72, 115, 216, 294, 489) constituie baza unor investigaţii viitoare pentru îmbunătăţirea lor.

Tentativele de inducere a imunotoleranţei specifice. Numeroşi cercetători au încercat să inducă în mod specific imunotoleranţa la cîini care urmau să devină receptori ai unui homotransplant renal. Metodele folosite au inclus circulaţia încrucişată (419), transplantarea de scurtă durată a unui rinichi al donatorului înainte de transplantarea definitivă a celui de al doilea rinichi al acestuia (2), injectarea unor extracte antigenice din ţesuturile donatorului * şi injectarea unor mici cantităţi de sînge de la donator (182). Cele mai deosebite rezultate sînt acelea ale lui Halasz şi colab. (182), care au constatat că homotransplantul de rinichi supravieţuieşte în medie 29,9 $\pm$ 10,9 zile la cîinii cărora li s-au administrat subcutanat, în prealabil, de două ori cîte 2 ml sînge de la donatorii respectivi, în comparaţie cu 8,1 $\pm$ 1,3 zile la cîinii de control; semnificaţia acestor observaţii nu a fost însă stabilită în mod clar. Celelalte procedee au dat rezultate nereproductibile, ceea ce face necesară continuarea investigaţiilor pentru stabilirea unor concluzii definitive.

Asupra acestor probleme se va reveni în alte capitole.

Factorii care limitează studiul experimental al transplantării organelor. Cu toate că domeniul experimental al transplantării organelor şi ţesuturilor este mult mai larg decît cel clinic, progresul cercetărilor experimentale este limitat de un număr de factori.

Un factor limitativ cu caracter general este faptul că tehnicile de anastomoză vasculară, care se folosesc de obicei, sînt aplicabile numai la animalele mari, ca pisica, oaia, cîinele şi maimuţa, iar la aceste specii nu s-au putut produce linii pure din punct de vedere genetic. Realizarea unor asemenea linii la aceste specii reprezintă o soluţie de compensare a acestui dezavantaj tehnic, dar rămîne încă o chestiune de durată, cu toate că în numeroase centre de cercetare s-au luat măsuri în acest sens. O soluţie alternativă, de asemenea explorată în prezent, este îmbunătăţirea tehnicilor de sutură vasculară, în aşa

* Lucrări personale, nepublicate.

Scanned with OKEN Scanner

fel încît ele să poată fi aplicabile vaselor de calibru mic, sau găsirea unor noi tehnici. Procedeele curente actuale sînt: a) anastomoza prin sutură obişnuită cu ajutorul unui microscop operator; b) anastomoza cu agrafe plasate cu ajutorul unui dispozitiv mecanic, după modelul imaginat pentru prima dată de Androsov (5) şi perfecţionat de alţi autori (521); c) anastomoză cu ajutorul unor substanţe adezive ca monomerul de metil-2-cianacrilat (175, 210).

În prezent, sînt disponibile linii pure de şoareci, şobolani şi cobai. Dintre aceste animale, şobolanul pare a fi cel mai potrivit pentru cercetări privind transplantarea organelor, pentru că are o talie rezonabilă, este foarte rezistent şi i se poate transplanta cu succes rinichiul la vasele gîtului (339) sau o a doua inimă în cavitatea abdominală (1), prin anastomoză vasculară. Iepurele va deveni curînd mai potrivit pentru asemenea experienţe, dat fiind că are o talie mare, că reacţiile sale imunologice sînt intense şi că sînt în curs de realizare, în acest scop, linii pure din punct de vedere genetic.

Animalele mici prezintă totuşi o serie de avantaje pentru studiul transplantării organelor şi ţesuturilor. În primul rînd sînt foarte potrivite pentru executarea unor transplante de ţesut libere, independente, fără anastomoze vasculare, şi, în această privinţă, există în prezent foarte numeroase date cu mare valoare pentru studii comparative. În al doilea rînd, animalele mici sînt mai uşor de procurat şi mai puţin costisitoare. În al treilea rînd, tentaţia de a trata animalul ca pe un om bolnav mai curînd decît ca pe un obiect de experiment şi de a face modificări repetate de tratament în funcţie de evoluţia stării sale generale (ceea ce a dus la multe confuzii în cercetările asupra transplantării organelor la cîine) pare a fi mai puţin frecventă în experienţele pe rozătoare.

Alături de aceşti factori cu caracter general, care limitează studiul problemelor biologice ale transplantării organelor şi ţesuturilor, există şi alţi factori, cu caracter particular.

Este foarte important ca transplantele experimentale de organe să fie plasate în regiunile în care ele pot să-şi desfăşoare funcţiile, pe de o parte pentru că suprimarea funcţiei poate să fie urmată de modificări suplimentare care să modifice cursul experimentului, iar pe de alta pentru că investigaţia activităţii organului transplantat poate furniza informaţii valoroase asupra fenomenului biologic principal. Măsura în care această condiţie impune restricţii în alegerea locului de plasare a organului transplantat variază de la organ la organ. De exemplu, transplantul de plămîn nu poate funcţiona decît dacă este ortotopic; transplantul de inimă şi transplantul de ficat pot funcţiona într-o oarecare măsură, dacă sînt heterotopice, dar funcţia lor este completă, normală, numai dacă sînt ortotopice; transplantul renal poate funcţiona în toate regiunile care permit anastomozarea vaselor normale cu vase corespunzătoare ale gazdei şi a ureterului transplantului cu vezica sau ureterul acesteia (un asemenea organ transplantat îşi menţine un nivel funcţional ridicat, chiar atunci cînd urina se drenează prin ureterostomie cutanată).

În cazul transplantării organelor vitale sînt necesare mijloace pentru a asigura supravieţuirea organismului pe durata operaţiei şi cîtva timp după aceea, pînă la reluarea activităţii transplantului. Pentru unele forme de transplant cardiac (autotransplant, homotransplant ortotopic, heterotransplant

Scanned with OKEN Scanner

ortotopic), operația nu este posibilă fără plasarea bolnavului în *by-pass* cardio-pulmonar total, intra- și postoperator, atît timp cît inima transplantată nu este în stare să funcționeze în mod adecvat. Dificultățile tehnice sînt mai mari în cazul transplantării ficatului (316, 347, 481, 483) și, dacă procedeul utilizat nu întrunește condițiile care să permită recuperarea funcțională rapidă, autotransplantarea întregului ficat și homo- sau heterotransplantarea hepatică ortotopică nu sînt posibile. Succesul depinde între altele de durata operației și modul în care este tratat transplantul în perioada de ischemie obligatorie intraoperatorie.

Rinichiul ridică probleme mai simple. La cîine, de exemplu, așa cum s-a mai arătat, transplantul renal care a fost ținut ischemic mai puțin de o oră, fără măsuri speciale de precauție, își restabilește funcția suficient de rapid, încît poate asigura supraviețuirea receptorului nefrectomizat bilateral. Astfel se explică utilizarea frecventă a transplantului renal ca model experimental pentru studii biologice. Mai mult, dacă există motive care să justifice bănuiala că recuperarea funcțională a rinichiului transplantat poate întîrzia, unul din rinichii receptorului poate fi lăsat pe loc, cel puțin în mod temporar, sau receptorul nefrectomizat bilateral poate fi supus postoperator unor hemodialize repetate.

Dificultățile tehnice ale transplantării plămînului au fost prezentate în amănunt într-o altă secțiune a acestui capitol. Reamintim aici numai că, la cîine, plămînul transplantat poate funcționa în mod satisfăcător în absența restabilirii debitului arterial bronhial. Nu s-a stabilit însă precis dacă recuperarea funcțională completă este posibilă în această circumstanță.

Un alt factor limitativ al cercetării experimentale în domeniul transplantării organelor este faptul că, în prezent, nu este posibilă restabilirea imediată a influxului nervos în formațiunile nervoase ale transplantului, dar acest fapt nu s-a dovedit a fi important. Rinichiul și ficatul par a funcționa satisfăcător în absența controlului nervos, iar plămînul transplantat s-a dovedit a răspunde de asemenea în mod adecvat necesităților organismului la cîine, dacă rămîne intactă cel puțin inervația unui lob major al plămînului opus (192). În schimb, pentru inima transplantată s-a arătat că este necesar un mecanism extrinsec de reglare funcțională, sub forma unui *pace-maker* artificial, pentru a se evita variații indezirabile ale întoarcerii venoase (546).

Natura relației dintre grefă și gazdă. Astăzi se cunosc numeroase cazuri de supraviețuire a homotransplantelor renale la om și cîine pe o perioadă mai mare decît 1 an, ceea ce a suscitat explicații asupra relației simbiotice dintre homotransplant și gazdă. Woodruff și colab. (548) au sugerat cinci circumstanțe care ar putea explica natura acestei relații: a) un înalt grad de compatibilitate între receptor și donator *ab initio*; b) suprimarea reactivității imunologice globale a receptorului prin tratament imunosupresor continuu; c) toleranța antigenică specifică față de antigenele transplantului, acest termen fiind folosit în sensul propus de Michie și Woodruff (325), care include toate formele de insuficiență centrală specifică a mecanismului de răspuns imunologic, indiferent de modul sau momentul în care se produce; d) o formă de inhibiție eferentă sau aferentă a mecanismului de răspuns imunologic; e) o combinație între acești factori.

Scanned with OKEN Scanner

Un grad înalt de compatibilitate tisulară între donator și receptor nu poate fi exclus, dar este excepțional la toate speciile. De asemenea, a fost evidențiat un oarecare grad de ineficiență a tuturor procedeelor folosite curent pentru a diminua răspunsul imunologic față de grefă. Alexandre și colab. (2), au arătat, cu o singură excepție, că la unii cîini cu homografe renale menținute în viață lung timp prin tratament cu imuran, cărora li s-au aplicat ulterior homografe de piele de la aceiași donatori sau de la alți cîini, elimină grefele de piele în maximum 32 de zile. Această observație pare să excludă posibilitatea ca supraviețuirea homografelor renale să fie datorită suprimării globale a reactivității imunologice. La om nu s-au făcut studii comparabile (de altfel, nici nu este recomandabil să se facă!), dar numeroși indivizi, receptori ai unui transplant renal au supraviețuit perioade de luni și chiar ani, în ciuda unor infecții repetate, survenite în afara spitalizării, ceea ce arată că, în ciuda tratamentului imunosupresor, mecanismele lor imunologice generale pot interveni uneori în mod eficace.

Rolul posibil al imunotoleranței specifice este mult mai dificil de stabilit. Aceasta ar putea fi incriminată cu ușurință în cazurile de supraviețuire a homotransplantului renal la cîini mult timp după încetarea oricărui tratament cu antimetaboliți (402, 403, 558), dar s-a stabilit cu certitudine că în aceste cazuri, receptorii nu sînt cu totul toleranți față de țesuturile donatorului (2). S-ar putea presupune că similitudinea antigenică între țesuturi diverse nu este perfectă, că pielea poate conține unele antigene care nu sînt prezente în rinichi și că eliminarea homografelor de piele la receptori cu homografe renale de la aceiași donatori se datorește în întregime reacției organismului împotriva acestor antigene specifice. Totuși s-a observat că homotransplantele renale ale acestor animale prezintă tulburări funcționale temporare pe durata în care homografele de piele de la aceiași donatori se află în curs de eliminare, cu condiția ca grefa de piele să se fi făcut la mai puțin de 6 luni după transplantarea rinichiului (2), ceea ce demonstrează nu numai că există antigene comune țesutului renal și pielii, ci și că animalele, la care homotransplantul de rinichi nu a depășit 6 luni de existență, nu devin complet tolerante față de aceste antigene comune.

Din cercetările lui Möller (350—352) reiese că așa-numitul fenomen de facilitare (*enhancement*), în care supraviețuirea prelungită a unui homotransplant se asociază cu prezența anticorpilor hemaglutinanți în serul receptorului, se datorește unei combinații de inhibiție aferentă și eferentă (37). Asupra acestor noțiuni se va insista într-un capitol următor. Aici menționăm numai că în prezent nu există date sigure care să ateste faptul că acest fenomen joacă un rol major în promovarea supraviețuirii transplantelor de organe; înainte de a se trage concluzii ferme în această privință, este necesar să se întreprindă cercetări minuțioase asupra anticorpilor hemaglutinanți la receptorii unor asemenea transplante.

Inhibiția eferentă pare însă a furniza explicația cea mai probabilă a acestui fenomen, care a fost denumit de către Woodruff (542, 546) „fenomen de adaptare"; homotransplantul pare a deveni, în anumite condiții, din ce în ce mai puțin vulnerabil la atacul imunologic. Pare plauzibil că „adaptarea", în sensul de mai sus, se poate produce în cazul homotransplantelor renale și

Scanned with OKEN Scanner

este dificil să se dea o altă explicație observațiilor citate mai sus ale lui Alexandre (2). Totuși, mecanismul precis al acestui fenomen rămîne încă incomplet elucidat.

Capitolele următoare aduc amănunte asupra mecanismului imunității de transplantare și a inducerii imunotoleranței față de țesuturile și organele străine.

BIBLIOGRAFIE

1. Abbott C. P., Lindsey E. S., Creech O., De witt C. W. — A. M. A. *Arch. Surg.* 1964, 89, 645.
2. Alexandre G. P. J., Murray J. E., Dammin G. J., Nolan B. — *Transplantation*, 1963, 1, 432.
3. Alican E., Hardy J. D. — *Amer. med. Ass.*, 1963, 183, 849.
4. Amirans M. T., Rohman M., Oka M., Kikkawa Y., Gueft B., State D. — *Surg. Forum*, 1964, 15, 177.
5. Androsov P. I. — *A. M. A. Arch. Surg.*, 1956, 73, 902.
6. Archer F. L., Gago O., Delgado E., Kolb L. W., Adams W. E. — *Surg. Forum*, 1964, 15, 154.
7. Arnasou B. G., Jankovik B. D., Waksman B. H. — *J. exp. Med.*, 1962, 116, 177.
8. Auerbach R. — *Develop. Biol.*, 1961, 3, 336.
9. Babel J., Bourquin J. B. — *Brit. J. Ophtal.* 1952, 36, 529.
10. Bäckdahl M., Consiglio V., Falconer B. — *Brit. J. plast. Surg.*, 1954, 7, 263.
11. Baitz R. Y., Hallenbeck G. A., Shorter R. G., Scott G. W., Owen C. A., Hunt Y. C. — *Arch. Surg.*, 1965, 91, 276.
12. Ballinger W. F., Scicchitano L. P., Baranski E. J., Camishion R. C. — *Surgery*, 1964, 55, 574.
13. Banting G. G., Best C. H. — *J. Lab. clin. Med.*, 1952, 7, 251.
14. Baranski E. J., Scicchitano L. P., Camishion R. C., Ballinger W. F. — *Surg. Forum*, 1963, 14, 200.
15. Barnes D. W. H., Corp M. J., Ilbery P. L. T., Loutit J. F., Neal F. E. — *Canad. Cancer Conf.*, 1959, 3, 367.
16. Barnes B. A., Flax M. H., Burke J. F., Barr G. — *Transplantation* 1963, 1, 351.
17. Barnes D. W. H., Ilbery P. L. T., Loutit J. F. — *Nature (Lond.)*, 1958, 181, 488.
18. Barnes A. D., Krohn P. L. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1957, 146, 505.
19. Barnes D. W. H., Loutit J. F. — *Nucleonics*, 1954, 12/5, 68.
20. Barnes D. W. H., Loutit J. F. — *Brit. J. Haemat.*, 1957, 3, 241.
21. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Micklem H. S. — *Mechanisms of Immunological Tolerance* (M. Hašek, A. Lengerova, M. Vojtišková), Ed. Czechoslovak, Academy of Sciences, Praga 1962, p. 371.
22. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Micklem H. S. — *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1962, 99, 374.
23. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Westgarth D. R. — *Gerontologia (Basel)*, 1959, 3, 137.
24. Barnicot N. A. — *J. Anat. (Lond.)*, 1948, 82, 233.
25. Barraclough C. A. — *Endocrinology*, 1961, 68, 62.
26. Barraquer J. I., Ariza H. E. — *Arch. Soc. Am. Ophtal.*, 1958, 1, 145.
27. Barraquer J. I., Ariza H. E. — *Arch. Soc. Am. Ophtal.*, 1958, 1, 164.
28. Barthel H., Barthel A. — *Beitr. Klin Chir.*, 1957, 194, 395.
29. Basu P. K., Miller I., Ormsby H. L. — *Amer. J. Ophtal.*, 1960, 49, 513.
30. Basu P. K., Sarkar P., Carré F. — *Amer. J. Ophtal.*, 1964, 58, 569.
31. Beilby J. O. W., Cade I. S., Jelliffe A. M., Parkin D. M., Stewart J. W. — *Brit. med. J.*, 1960, 1, 96.
32. Bencini A., Bellinazzo P. — *Angiology*, 1953, 4, 483.
33. Benfield J. R., Gago O., Nigro S. L., Fry W. A., Adams W. E. — *Surg. Forum*, 1963, 14, 198.
34. Bierring F. — Ciba Foundation Symposium on Haematopoiesis: Cell production and its regulation, Ed. Churchill, Londra, 1960, p. 185.
35. Biggers J. D. — *Experientia*, 1957, 13, 483.

Scanned with OKEN Scanner

36. Billingham R. E. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, 64, 799.
37. Billingham R. E., Brent L., Medawar F. B. — *Transplant. Bull.*, 1956, 3, 84.
38. Billingham R. E., Medawar P. B. — *J. exp. Biol.*, 1952, 29, 454.
39. Billingham R. W., Parkes A. S. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1955. 143, 550.
40. Billingham R. E. şi Rycroft B. W. — Corneal grafts (B. W. Rycroft), Ed. Butterworths, Londra, 1955, p. 195.
41. Billingham R. E., Sparrow E. M. — *J. Embryol. exp. Morph.*, 1955, 3, 265.
42. Bittner J. J., Huseby R. A. — A Symposium on steroid Hormones (E. S. Gordon), Wisconsin University Press, Wisconsin 1950, p. 361.
43. Blanco G., Adam A., Rodriguez-Perez D., Fernandez A. — *Arch. Surg.*, 1958, 76, 20.
44. Blau J. N., Waksman B. H. — *Immunology*, 1964, 7, 332.
45. Blumenstock D. A., Collins J. A., Hechtman H. B., Hosbein D. Y., Lempert N., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 120, 677.
46. Blumenstock D. A., Collins J. A., Hechtman H. B., Hosbein D. Y., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Dist. Chest.*, 1964, 45, 484.
47. Blumenstock D. A., Collins J. A., Hechtman H. B., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 99, 882.
48. Blumenstock D. A., Collins J. A., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Surgery*, 1962, 51, 541.
49. Blumenstock D. A., Hechtman H. B., Collins J. A. — *J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1962, 44, 771.
50. Blumenstock D. A., Kahn D. R. — *J. surg. Res.*, 1961, 1, 40.
51. Borrie J., Lichter I. — *Thorax*, 1964, 19, 383.
52. Bosova N. M. — *Bull. exp. Biol. Med.*, 1962, 53, 88.
53. Bottin J. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1936, 12, 872.
54. Bradbury S., Micklem H. S. — *Amer. J. Path.*, 1965, 46, 263.
55. Braid H. L., Hagerty R. F., Lee W. H. — *Transplantation*, 1966, 4, 94.
56. Brent L., Medawar F. B. — *Brit. med. J.*, 1963, 2, 269.
57. Bridges J. M., Neill D. W., Lehmann H. — *Brit. med. J.*, 1961, 1, 1 349.
58. Bridges J., Pritchard J. J. — *J. Anat. (Lond.)*, 1958, 92, 28.
59. Brock D. R., Starzl T. E. — *Exp. Mol. Path.*, 1962, 1, 187.
60. Brooks J. R., Gifford G. H. — *Transplant. Bull.*, 1959, 6, 100.
61. Buecherl E. S. — *Thoraxchirurgie*, 1960, 8, 362.
62. Buecherl E. S. — *Langenbecks Arch. klin. Chir.*, 1960, 295, 720.
63. Buecherl E. S. — *Langenbecks Arch. klin. Chir.*, 1961, 298, 738.
64. Buecherl E. S., Lesch P., Nasseri M. — *Langenbecks Arch. klin. Chir.*, 1961, 296, 660.
65. Buecherl E. S., Nasseri M. — *Bull. Soc. int. Chir.*, 1961, 20, 584.
66. Buecherl E. S., Nasseri M., Prondzynski B. von — *J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1964, 47, 455.
67. Bürki E. — *Ophthalmologica (Basel)*, 1947, 114, 288.
68. Calne R. Y. — *Lancet*, 1960, 1, 417.
69. Calne R. Y. — Renal Transplantation. Ed. Arnold, Londra, 1963.
70. Calne R. Y. — *Proc. roy. Soc. Med.*, 1963, 56, 935.
71. Calne R. Y. — *Brit. med. Bull.*, 1965, 21, 166.
72. Calne R. Y., Alezandre G. P. J., Murray J. E. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 99, 743.
73. Calne R. Y., Loughridge L. W., Mc Gillvray J. B., Zilva J. F., Levi A. J. — *Brit. med. J.*, 1963, 2, 645.
74. Calne R. Y. şi Murray J. E. — *Surg. Forum*, 1961, 12, 118.
75. Calne R. Y., Pegg D. E., Pryse-Davies J., Brown F. L. — *Brit. med. J.*, 1963, 2, 651.
76. Carrel A., Guthrie C. C. — *Amer. Med.*, 1905. 10, 1 101.
77. Carrel A., Guthrie C. C. — *Science*, 1905, 22, 473.
78. Carrico C. J., Caln C. D., Lightfoot S. A., Allsman A., Shires G. T. — *Surg. Forum*, 1963, 14, 10.
79. Carter T. C., Lyon M. F., Phillips R. J. S. — *J. Genet.*, 1955, 53, 154.
80. Castroviejo R. — Atlas de queratectomias y queratoplastias, El. Salvat, Barcelona, 1964, p. 103.
81. Ceppellini R., Curtoni S., Leigheb L., Mattiuz P. L., Miggiano V., Visetti G. — *Transplantation*, 1966, 4, 103.

Scanned with OKEN Scanner

532. Webb W. R., Howard H. S., Neely W. A. — *J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1959, 37, 361.
533. Weiss L. — *Anat. Rec.*, 1963, 145, 413.
534. Weelling W., Bekkum D. W. van — *Nature (Lond.)*, 1958, 182, 946.
535. Werder A. A. şi Hardin C. A. — *Surgery*, 1954, 36, 371.
536. Wesolowski S. A. — Evaluation of tissue and prosthetic vascular grafts, Ed. Thomas, Springfield, 1962, p. 192.
537. Wesolowski S. A., Fennessey J. F. — *Circulation*, 1953, 8, 750.
538. Willier B. H. — Analysis of Development (B. H. Willier, P. A. Weiss, V. Hamburger), Ed. Saunders, Philadelphia, 1955.
539. Willman V. L., Cooper T., Cian L. G., Hanlon C. R. — *Surg. Gynec. Obstet.*, 1962, 115, 299.
540. Wilson R. E., Zollinger R. M., Mahan J. H., Brooks J. R. — *Surg. Forum*, 1959, 10, 94.
541. Woodruff M. F. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, 64, 1 014.
542. Woodruff M. F. A. — Biological Problems of grafting (F. Albert, C. Lejeune-Ledant), Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1959, p. 83.
543. Woodruff M. F. A. — The Transplantation of Tissues and Organs, Ed. Thomas, Springfield, Illinois, 1960.
544. Woodruff M. F. A. — *Brit. med. J.*, 1964, 1, 1 457.
545. Woodruff M. F. A. — *New Med. J.*, 1964, 28, 157.
546. Woodruff M. F. A. — *Brit. med. Bull.*, 1965, 21, 1 965.
547. Woodruff M. F. A., Nolan B. — *Lancet*, 1963, 2, 425.
548. Woodruf M. F. A., Robson J. S., Nolan B., Lambie A. T., Wilson T. I., Clark J. G. — *Lancet*, 1963, 2, 675.
549. Wrezlewicz W. — *Pol. Przegl. Chir.*, 1963, 35, 1 175.
550. Wyburn G. M., Bacsich P. — *Brit. J. Plast. Surg.*, 1955, 8, 177
551. Wyburn G. M., Bacsich P. — *Transplant. Bull.*, 1956, 3, 3.
552. Yeh T. J., Ellison L. T., Ellison R. G. — *Amer. Rev. resp. Dis.*, 1962, 86, 791.
553. Yoffey J. M. — *Lancet*, 1962, 1, 206.
554. Young F. A. — *Surgery*, 1945, 17, 616.
555. Zhenevskaia R. P. — *Rev. canad. Biol.*, 1962, 21, 457.
556. Zorzoli G., Gualtieri V., Serra B., Bergamini D. — *Bronches*, 1958, 8, 354.
557. Zukoski C. F. — *Surgery*, 1961, 50, 926.
558. Zukoski C. F., Callaway J. M. — *Nature (Lond)*, 1963, 198, 706
559. Zukoski C. F., Lee H. M. Hume D. M. — *Surg. Forum*, 1960, 11, 470.
560. Zukoski C. F., Lee H. M., Hume D. M. — *Surgery*, 1961, 50, 926.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL al II-lea

ASPECTELE TEORETICE ALE TRANSPLANTĂRII ORGANELOR ŞI ŢESUTURILOR

A. PROBLEME FUNDAMENTALE ÎN TRANSPLANTAREA ORGANELOR ŞI ŢESUTURILOR

Dacă organele şi ţesuturile ar putea fi transplantate între doi indivizi cu aceeaşi uşurinţă ca între diferitele părţi ale aceluiaşi individ, nu ar fi exagerat să afirmăm că chirurgia ar intra într-o nouă fază. Chirurgia a reuşit să controleze o serie de factori care influenţează succesul unei transplantări: alegerea speciei, natura şi dimensiunea grefei, condiţiile în care este necesar să se afle receptorul, calea şi tehnica de aplicare a grefei, reactivitatea receptorului condiţionată de *stress*-ul operator şi funcţiile endocrine etc.

În realizarea cu succes a unui transplant rămîne însă pe primul plan problema relaţiilor genetice dintre donator şi receptor. Problema majoră care se pune în prezent este de a putea stabili legi sau măcar criterii care să ne ajute la înţelegerea reacţiei homografelor în organismul receptor şi să o explice din punct de vedere biologic. Produsul final al inegalităţii genetice dintre indivizii aceleiaşi specii sau de specii diferite este diversitatea antigenică cu toate consecinţele ei şi, din păcate, în prezent, posibilităţile noastre de rezolvare a acestei diversităţi antigenice sînt încă foarte reduse.

Nu avem actualmente mijloace eficiente de „tipizare" a donatorului faţă de viitorul receptor, compatibilitatea grupelor sanguine nefiind în corelaţie cu cea tisulară, iar alte metode fiind abia în faza ipotezelor şi a încercărilor.

O altă întrebare pe care o ridică transplantarea organelor este dacă un transplant reuşit poate avea de-a lungul timpului vreun efect asupra receptorului şi dacă nu i-ar putea provoca acestuia tulburări grave. În această privinţă, răspunsul poate fi dat cu destul de multă certitudine. Într-adevăr, din datele de pînă acum, care sînt destul de numeroase, nu a reieşit că ar exista vreun inconvenient pentru receptor, ca urmare a supravieţuirii unui transplant străin.

Putem afirma, deci, că nu constituie un inconvenient faptul că receptorul care acceptă permanent o grefă devine un mozaic sau o himeră de ţesuturi aparţinînd pe linie embriologică originară la doi sau mai mulţi indivizi. Prin diferite metode s-au transplantat cu succes homografe permanente atît la mamifere, cît şi la păsări, fără ca receptorii să fi avut ulterior vreun deza-

Scanned with OKEN Scanner

vantaj. Se cunosc situaţii similare, care pot apărea şi în mod natural în unele cazuri, cum se întîmplă, de exemplu, la gemenii de bovidee. Astfel, se pot efectua cu succes homografe de piele la gemenii de bovidee, chiar dacă ei diferă între ei din punct de vedere genetic, cu condiţia ca să existe între ei un himerism eritrocitar instalat în mod natural în cursul gestaţiei.

Acestui himerism eritrocitar, preexistent, obţinut pe cale naturală în timpul gestaţiei, i se poate adăuga ulterior un himerism artificial, prin transplant de piele, care este perfect tolerat de gazde. În acest caz particular survine de asemenea o caracteristică şi anume, gemenul femelă este steril. Asocierea acestor trei fenomene (himerismul eritrocitar, toleranţa la homografă reciprocă de piele şi sterilitatea femelei) la gemenii de bovidee se explică prin condiţiile vieţii lor embrionare în cursul căreia are loc un schimb reciproc de sînge (himerismul eritrocitar). Acesta din urmă condiţionează toleranţa ulterioară la grefa de piele, sterilitatea fiind doar un fapt concomitent.

De altfel, practica a arătat că chirurgul trebuie să se teamă în primul rînd de eventualitatea ca grefa să nu se prindă şi să fie eliminată, iar de tulburările ipotetice ale gazdei, ca urmare a prinderii homotransplantului, numai în al doilea rînd. Şansele de supravieţuire a grefelor reprezintă problema cheie a transplantării organelor şi ţesuturilor şi ele depind de foarte mulţi factori, dintre care se detaşează pe primul loc relaţiile dintre donator şi receptor, caracterele ţesutului sau organului de grefat şi condiţiile în care se găseşte organismul receptor.

Medawar şi Peer (32) sînt de părere că, în extrem de numeroasele şi diversele cazuri experimentale, cu diferite variante şi situaţii particulare, există un sistem de legi fundamentale genetice şi imunologice care guvernează comportamentul oricărei grefe, indiferent de locul transplantării; asemenea lege se afirmă cu maximum de intensitate în cazul homografelor de piele. Grefa de piele este într-adevăr aceea care, în condiţii normale dă cel mai mare număr de eşecuri. Succesul parţial sau total, obţinut cu homografe din alte ţesuturi sau chiar cu grefe de piele plasate în alt loc decît la piele, se datoreşte dispensării sau derogării grefelor de la una sau mai multe din legile transplantării, aceste fenomene putînd fi numai uneori explicate cauzal.

Aceste cazuri trebuie considerate însă totdeauna ca un privilegiu, ca particulare, şi nu ca o regulă. Ne putem explica succesul grefelor de cornee prin aceea că locul plasării lor este ferit de posibilitatea pătrunderii agenţilor de distrugere; de asemenea, succesul grefei în creier este explicabil prin faptul că stimulul antigenic la acest nivel nu mai poate declanşa producerea de anticorpi. Succesul grefelor de oase şi artere este şi el explicabil; aceeaşi situaţie, de caz particular, o au şi unele grefe endocrine.

Reacţia receptorului faţă de grefa donatorului variază pe o scară foarte largă, mergînd de la totala acceptare, cum este cazul grefelor între gemenii monovitelini, spre diferite grade de toleranţă, ca în cazul gemenilor bivitelini şi al grefelor de tumori, pînă la cea mai marcată intoleranţă, care intervine în cazul grefelor de piele. A încerca lămurirea mecanismului reacţiei organismului faţă de grefa de piele înseamnă a aborda problema în forma ei cea mai complexă. Însă, pentru a înţelege diferitele aspecte ale transplantării, trebuie cunoscute în prealabil legile genetice care guvernează acceptarea de către receptor a organelor şi ţesuturilor transplantate.

Scanned with OKEN Scanner

B. ASPECTELE GENETICE ALE TRANSPLANTĂRII DE ORGANE ŞI ŢESUTURI

Abordarea studiului biologici transplantării de pe poziţii ştiinţifice pentru identificarea legilor genetice ale transplantării implică posibilitatea reproducerii experienţelor şi, deci, a existenţei unor animale de experienţă identice din punct de vedere genetic. Importanţa practică a animalelor identice din punct de vedere genetic, a liniilor pure, este mai mult decît evidentă. Fiecare experiment asupra imunităţii de transplantare trebuie standardizat pe baze genetice, ori de cîte ori este posibil, iar cînd nu se poate crea această condiţie, trebuie ţinut seama de această sursă de eroare posibilă. În domeniul experimental, standardizarea genetică se poate reduce la alegerea animalelor cu origine genetică cunoscută şi la folosirea unor linii genetice pure, neînrudite între ele, pentru donatorii şi receptorii de grefe. Variabilitatea genetică a populaţiei mamiferelor este însă extrem de mare şi identitatea genetică nu survine decît la gemenii monovitelini. Populaţii identice din punct de vedere genetic nu se pot obţine decît prin derivarea îndelungată din părinţi identici, total homozigoţi. Dacă părinţii sînt numai aproape identici, fiind heterozigoţi la nivelul unui singur *locus,* descendenţii lor nu vor mai fi identici între ei.

Asemenea linii pure de animale s-au putut obţine prin încrucişarea strictă a descendenţilor mai multor generaţii, rezultatele cele mai satisfăcătoare fiind obţinute la şoareci. Astăzi se cunosc peste 60 de linii de şoareci, pure din punct de vedere genetic, obţinute în diferite laboratoare de pe glob.

Obţinerea liniilor genetice pure la alte specii de animale, prin încrucişarea repetată între generaţii de frate şi soră, nu este foarte înaintată. Progrese s-au obţinut cu şobolani, hamsteri şi cobai, fără a avea însă pînă în momentul de faţă linii absolut pure (15). Din păcate nu s-a găsit explicaţia acestui fenomen (32). Chiar şi la şoarecii consideraţi puri şi identici genetic, uniformitatea este numai probabilă şi nu un fapt bine stabilit, deoarece în decursul generaţiilor apar divergenţe, aşa-numitele sublinii, datorită unor mutaţii sau unei heterogenităţi evidenţiată în timp (32).

Ca urmare a acestei realităţi, studiile genetice privind transplantarea organelor şi ţesuturilor s-au putut efectua în marea lor majoritate folosind şoarecii ca modele experimentale.

1. GENELE ŞI TRANSPLANTAREA ORGANELOR ŞI ŢESUTURILOR

a) **Genele de histocompatibilitate la şoareci. Locus H-2.** Antigenele de transplantare care duc la reacţia imunologică de rejecţie a grefei sînt determinate de o serie de gene denumite gene de histocompatibilitate sau „gene H". Acestea se moştenesc după legile simple mendeliene şi se consideră, în general, ca fiind dominante (13), deşi o serie de experienţe au demonstrat că dominanţa nu este completă (11, 38). Genele H au fost cercetate mai ales la şoareci, din motivele arătate mai sus. Pînă acum s-au investigat în mod deosebit 6 gene H sau *loci* (numerotate de la 1 la 6), iar dintre acestea în mod cu totul special *locus* H-2, mai ales de către Snell şi colab. (48). Acesta este cel mai puternic *locus* dintre cele cunoscute, determinînd antigene care

Scanned with OKEN Scanner

dau naştere unui răspuns imunologic viguros, corelat cu rejecţia accelerată a grefei de piele şi grefelor tumorale şi cu elaborarea de anticorpi serici şi tisulari (44). *Locus* H-2 a fost determinat pentru prima dată serologic (aşa-numitul antigen II). S-au descris cel puţin 18 alele (variante) ale acestui *locus*, desemnate prin litere (a, b, c, d etc.), care pot da naştere la combinaţii variate de antigene (se cunosc peste 26 de combinaţii), cu mai multe reacţii încrucişate între şoarecii purtători de diferite alele.

S-a stabilit că gena H-2 este localizată pe acelaşi cromozom şi în interiorul aceluiaşi lincaj (grupul al IX-lea), ca şi genele care determină anumite caractere ale structurii vertebrale a cozii, ceea ce a permis să se obţină determinarea numeroaselor alele ale acestui *locus* şi distribuţia lor la diferite linii de şoareci.

Alţi loci de histocompatibilitate. Efectul celorlalţi *loci* H este mult mai slab în comparaţie cu *locus* H-2. În *locus* H-1 s-au identificat cel puţin 4 alele (a, b, c, d). *Locus* H-1 şi H-4 fac parte din acelaşi lincaj cu cromozomul care determină albinismul şi ochii roşii (49). Detectarea acestor *loci* (H-1, H-3 şi H-4) s-a făcut pe baza unor experienţe privind rejecţia ţesuturilor transplantate. Astfel s-a văzut că deosebirile la nivelul *locus* H-1 duc la apariţia unor anticorpi neutralizanţi serici, chiar în prezenţa persistenţei grefei de piele (53). *Loci* H-5 şi H-6 au fost detectaţi numai serologic şi pînă în prezent nu au fost asociaţi fenomenului de eliminare a grefei. Prin încrucişări adecvate, Snell şi Bunker (47) au obţinut un grup de linii genetice de şoareci congenic rezistenţi (CR), care diferă între ei primar printr-un singur locus de histocompatibilitate. Unul dintre părinţi a fost din linia C57 BL/10, celălalt din alte linii, tipizate tot pentru *locus* H-2^b (129 R, CB6, D2W). Prin aceste încrucişări s-au identificat alţi 5 *loci* de histocompatibilitate, denumiţi cu simbolurile H-7, H-8, H-9, H-10 şi H-11. Puterea lor este însă mai slabă decît a primilor *loci* H identificaţi (H-1, H-6).

Loci de histocompatibilitate pe cromozomi sexuali. Eichwald şi Silmser (16) sînt primii autori care au demonstrat prezenţa unui *locus* H pe cromozomii sexuali şi anume pe cromozomul Y al majorităţii, dacă nu chiar al totalităţii liniilor de şoareci. Antigenul determinat de acest *locus* s-a numit antigenul Y de histocompatibilitate şi produce eliminarea de homografă de piele specifică pentru sexul masculin, fenomen cunoscut în literatură sub denumirea de „fenomenul Eichwald-Silmser". Pînă la descoperirea acestui fenomen se ştia că la şoarece cromozomul Y nu are alţi *loci* activi, cu excepţia celor determinanţi ai sexului (52). Acest *locus* H de pe cromozomul Y este slab antigenic şi comparabil ca putere cu *loci* H-1 sau H-3. În condiţia unei reacţii pozitive de eliminare determinată de acest *locus*, grefa este eliminată după 3—4 săptămîni. Deşi încercările de a găsi un *locus* de histocompatibilitate legat de cromozomul X au fost numeroase, singurul autor care a obţinut rezultate pozitive este Bailey (1). Spre deosebire de cel legat de cromozomul Y, *locus*-ul legat de cromosomul X s-a dovedit specific pentru o anumită linie de şoareci şi s-a manifestat prin eliminarea grefei de piele între hibrizii masculi de tip F1.

b) **Gene de histocompatibilitate la alte specii animale.** Obţinerea de linii identice din punct de vedere genetic la şoareci a făcut ca studiile de compatibilitate genetică să se facă în special pe aceste animale. Studiul asupra

Scanned with OKEN Scanner

sistemelor de histocompatibilitate la alte specii a atras atenţia cercetătorilor abia în ultimii ani. La baza interesului pentru urmărirea histocompatibilităţii la alte vertebrate au stat două cauze majore: în primul rînd, obţinerea de informaţii asupra sistemului H la om, care erau de importanţă deosebită pentru aplicarea transplantelor în clinică; în al doilea rînd, studiile imunogenetice comparative, inclusiv reacţia la homografă, prezentau o importanţă biologică generală. Informaţii asupra genelor H la populaţii neidentice genetic sînt foarte greu de obţinut. Încrucişări îndelungate între generaţii de frate şi soră s-au practicat la puţine specii animale.

Peşti. Experienţele de supravieţuire a transplantelor de aripioare înotătoare (29, 30) şi solzi (23, 25) au arătat că peştii inferiori sînt capabili de răspunsuri la homografă, similare cu acelea ale speciilor mai evoluate, ceea ce înseamnă că peştii dotaţi cu schelet osos sînt reactivi imunologic şi, deci, posedă antigene de histocompatibilitate. Kallman (29) a obţinut 2 linii pure de *Xiphophorus maculatus* şi a găsit că ele se deosebesc prin cel puţin 3 *loci* de histocompatibilitate. Hildemann (23) a găsit hemaglutinine în serul peştilor care primiseră două serii de grefe de solzi incompatibili, ceea ce sugerează că anumite antigene H sînt comune cu antigenele eritrocitare.

Amfibii. Ca şi peştii, amfibiile s-au dovedit capabile de a elimina ţesuturile străine. Hildemann şi Haas (24, 26) au demonstrat reacţia la homografă la larvele de broască, sugerînd existenţa unor antigene H diferite la aceste populaţii. Ei au practicat 573 de grefe de piele în diverse combinaţii de donator-receptor şi au constatat că toate grefele au fost eliminate. Se pare că există o serie de antigene încrucişate, deoarece toleranţa sau imunitatea obţinută într-o anumită combinaţie de receptor-donator se extinde şi asupra altor animale. Din lipsa unor populaţii omogene de broaşte nu s-a putut determina numărul sistemelor de histocompatibilitate. În cazul lui *Triturus viridescens*, un *locus* H care are o influenţă puternică asupra grefei de piele a putut fi localizat în cromozomul Y de sex (37).

Păsări. O altă direcţie de cercetare a genelor de histocompatibilitate a fost de a căuta eventuala lor legătură cu diferite alte antigene cunoscute, în special cu grupele sanguine. În acest sens există o serie de lucrări interesante efectuate pe găini (12, 19, 42). Schierman şi colab. (42) au arătat că există o legătură strînsă între *locus*-ul grupului sanguin B de la puii de găină şi efectele de histocompatibilitate ale *locus*-ului respectiv. Faptul a fost confirmat ulterior de alţi autori (12, 19). În schimb, *loci* A, E, D, L, care controlează diferite antigene eritrocitare la pui, nu par a fi asociaţi cu eliminarea homografei (42), deoarece reactivii sanguini tipizaţi pentru aceste trei sisteme nu aglutinează limfocitele omologe. Reactivii tipizaţi pentru sistemul B şi chiar C dau reacţii pozitive de limfoaglutinare (41), deci putem presupune că sistemele de grup eritrocitar B şi C au rol şi în histocompatibilitate. Studiindu-se corelaţia dintre incompatibilitatea *locus*-ului C (de grup sanguin) şi eliminarea grefei de piele, s-a observat că rezultatele sînt deosebite în funcţie de linia de găini folosite. La linia de găini G nu s-a obţinut o corelaţie directă (43), pe cînd cu o altă linie de păsări (linia 9), rezultatele au fost pozitive: mai multe grefe de piele compatibile pentru *locus*-ul B au fost eliminate relativ repede. O parte din păsările care au prezentat rejecţie de tip accelerat a grefei de

Scanned with OKEN Scanner

piele au produs şi hemaglutinine serice anti-C, după mai multe injecţii de hematii de grup C. Rezultatele obţinute pe această linie de păsări (de rasă albă Leghorn), prin schimburi de grefă între membrii ei, au arătat că *locus*-ul C de grup sanguin este şi un *locus* de histocompatibilitate sau este foarte strîns legat de un asemenea *locus*. S-au cercetat de asemenea efectele a două alele C asupra grefelor de piele şi s-au obţinut rezultate opuse: una dintre ele a avut efecte marcate asupra scurtării supravieţuirii grefei de piele, în timp ce cealaltă nu s-a deosebit din acest punct de vedere de alţi *loci* de histocompatibilitate a populaţiei respective (43). Ca importanţă, *locus* C pare a controla un sistem de histocompatibilitate ceva mai slab decît *locus* B, antigenele eritrocitelor de grup C fiind mai slab antigenice decît cele de grup B.

O dată stabilită corelaţia dintre antigenele de grup sanguin B şi C şi antigenele de histocompatibilitate, Walford şi colab. (51), bazîndu-se pe unele date cunoscute anterior (3) şi anume că *loci* B şi C controlează şi antigenele limfocitare la păsări, au putut arăta că tipizarea limfocitelor poate constitui un mod mulţumitor de detectare a antigenelor de transplantare. Recent, o serie de lucrări experimentale se ocupă tocmai de tipizarea limfocitelor şi a leucocitelor ca metodă de detectare a antigenelor de transplantare la diferite specii de animale şi la om, obţinîndu-se rezultate interesante şi încurajatoare. Această problemă va fi tratată mai pe larg într-unul din capitolele următoare, fiind strîns legată de posibilităţile practice de tipizare a donatorilor faţă de receptor.

Şobolani. Billingham şi Silvers (6) au obţinut linii de şobolani izohistogenetici, făcînd posibil studiul sistemului H la aceste specii. Primul antigen H investigat a fost denumit B şi sistemul la care aparţine R-1 (8). Antigenul B se moşteneşte ca o dominantă mendeliană. El este prezent pe eritrocitele şi celulele neoplazice ale diferitelor linii de şobolan şi poate fi detectat prin testul de hemaglutinare sau prin cel citotoxic. Ulterior s-a detectat încă un antigen, denumit C. Bogden şi Aptekman (9) au postulat existenţa a 3 alele în sistemul R-1, care ar controla prezenţa celor două antigene B şi C. Deşi din datele lor rezultă că B nu este singurul antigen H care influenţează rezultatele, includerea antigenului C în sistemul R-1 nu se poate face cu certitudine (4). Din păcate, aceeaşi denumire de antigen B a fost folosită şi de alţi autori (17) pentru un antigen eritrocitar, care pare a fi tot un antigen H (31). Palm (35) face distincţie între cele 2 antigene, denumind B-1 pe cel eritrocitar (17) şi B-2 pe cel al lui Bogden şi Aptekman (9).

Tot Palm (35) a identificat încă 3 antigene (desemnate cu numere de la 1 la 3) cu ajutorul hemaglutinării. Dintre acestea, două antigene (1 şi 3) sînt produse alelice ale unei singure gene. Cele 3 antigene ale lui Palm (35) nu sînt identice cu antigenele eritrocitare, evidenţiate anterior la şobolan.

Antigenele 1 şi 3 s-au dovedit a fi antigene H (36), iar antigenul B al lui Bogden şi Aptekman (9) s-ar afla în acelaşi lincaj, ceea ce înseamnă că antigenele 1, 3 şi B sînt probabil alelele aceluiaşi sistem H (4).

La populaţiile heterozigote, situaţia este mult mai complexă. Din cauza multiplilor *loci* şi a alelelor diferite există un număr enorm de antigene. Un receptor de grefă de piele de la un donator oarecare va fi sensibilizat nu numai faţă de acel donator particular, ci şi faţă de alţi donatori potenţiali,

Scanned with OKEN Scanner

care au cel puţin un antigen comun cu donatorul originar. Deci, incidenţa eliminării secundare accelerate poate indica în acest caz numărul de antigene operative şi, indirect, numărul de *loci* H (26, 39).

Cobai. La această specie există foarte puţine date asupra antigenelor H. Baner (2), urmărind 2 linii relativ pure de cobai, a găsit 4—6 *loci* de histocompatibilitate. După eliminarea grefelor de piele, în serul receptorului de grefă s-au putut identifica anticorpi leucocitari activi faţă de celulele donatorului (50).

Hamsteri. Hildemann şi Walford (27) au constatat că grefele de piele schimbate între hamsteri sirieni au o perioadă de supravieţuire foarte diferită, care se întinde pe o durată de 19—550 de zile şi au explicat fenomenul prin lipsa unui sistem H puternic între animalele aceleiaşi colonii. Existenţa unui sistem H puternic la această specie a fost însă demonstrată de Billingham şi colab. (5, 7) şi anume prin faptul că grefele de piele schimbate între 3 familii de hamsteri, care se deosebeau între ele printr-un număr mic de gene H, au fost eliminate în 2 săptămîni.

Oameni. Informaţiile asupra existenţei unui sistem H la om sînt încă fragmentare. Studiile respective, prealabile, la celelalte specii animale oferă unele sugestii şi posibilităţi de a aborda antigenele de histocompatibilitate la om.

2. DETECTAREA ANTIGENELOR H PE ERITROCITE

Se ştie că sisteme H importante controlează unele antigene prezente pe eritrocite la şoareci (21), şobolani (8), găini (42), iepuri (22) şi, posibil, la peşti teleosteeni (23). Cercetările intreprinse la om nu au pus în evidenţă prezenţa unor antigene de histocompatibilitate pe eritrocite şi nici prezenţa unor antigene comune de grup sanguin şi histocompatibilitate (54). Înainte însă de a face cu certitudine afirmaţia că asemenea antigene nu există la om, este necesar să se arate că grefele incompatibile nu induc formarea de hemaglutinine, cu excepţia cazului cînd grefa a fost contaminată cu un număr semnificativ de hematii. Carkson şi Gorer (10) au observat apariţia hemaglutininelor în serul unui copil cu arsuri, căruia i s-au aplicat grefe întinse de piele de la tatăl său. Hemaglutininele au reacţionat cu eritrocitele donatorului, dar anamneza clinică a stabilit ulterior că acest copil primise şi transfuzii de sînge, ceea ce ar explica prezenţa hemaglutininelor. Pînă acum nu s-a putut demonstra prezenţa sigură a hemaglutininelor în serul receptorului uman, ca urmare a acţiunii antigenelor de transplantare.

3. DETECTAREA ANTIGENELOR H PE LEUCOCITE

La om, ca şi la alte specii, cel puţin unele, dacă nu toate antigenele H, sînt prezente pe leucocite. Friedman şi colab. (18) au arătat că imunizarea cu celule albe poate provoca un răspuns de tip *second set* la grefa de piele. Grefele incompatibile dau naştere la leucoaglutinine (4) şi anticorpi limfocitotoxici (51). Prin urmare, analiza antigenelor leucocitare umane pare foarte interesantă şi foarte utilă. S-au încercat diferite metode de detectare a acestor antigene, care vor fi prezentate, pe larg, într-un capitol următor. Aici menţio-

Scanned with OKEN Scanner

năm pe scurt că numărul de antigene din leucocite este foarte mare şi că ele provoacă reacţii încrucişate numeroase, ceea ce explică frecvenţa ridicată a cazurilor de imunitate încrucişată evidenţiată la grefele de piele umană. Pînă în prezent s-au identificat două sisteme de histocompatibilitate: van Rood şi van Leuwen (40) au descris un asemenea sistem, desemnat cu cifra 4, cu cel puţin două forme alelice (4 *a* şi 4 *b*), iar Paine şi colab. (34) au descris un sistem trialelic pe care l-au denumit LA.

C. LEGILE GENETICE ALE TRANSPLANTĂRII ŢESUTURILOR ŞI ORGANELOR

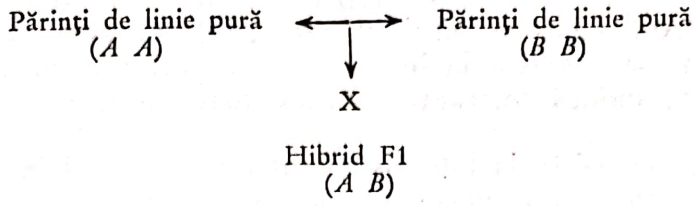
Succesul sau eliminarea unui transplant este determinat de genele de histocompatibilitate (H) ale donatorului şi receptorului. Nu este absolut necesar ca donatorul şi receptorul să fie identici din punct de vedere genetic pentru ca transplantul să reuşească. Un singur antigen de histocompatibilitate, prezent la donator dar absent la receptor, este însă suficient pentru a declanşa reacţia de rejecţie a grefei. Dacă reacţia imunologică este slabă, dar continuă, transplantul poate fi reţinut definitiv. Singura condiţie genetică pentru succesul unui transplant este, deci, ca donatorul să nu aibă antigene care lipsesc la receptor şi care să fie suficient de puternice pentru a declanşa o reacţie a receptorului contra grefei. Faptul că *loci* H de histocompatibilitate se transmit în chip dominant mendelian a permis lui Snell (45) să formuleze o serie de 5 legi genetice cu privire la transplantare.

a) *Prima lege* se bazează pe experienţe asupra transplantării tumorilor la linii pure de şoareci. Această lege afirmă că grefele unei linii sînt acceptate de membrii liniei respective şi eliminate de membrii altor linii; homografele se integrează totdeauna cînd sînt practicate între indivizi de aceeaşi linie genetică, comportîndu-se ca o autografă, şi sînt eliminate totdeauna cînd indivizii respectivi aparţin unor linii genetice diferite, comportîndu-se ca o homografă. Transplantul *recunoscut* de receptor ca fiind străin din punct de vedere genetic dă naştere unui răspuns imun care-l respinge (elimină). Noţiunea de recunoaştere reclamă unele precizări. Nu orice grefă străină induce recunoaşterea sa ca atare şi, implicit, declanşarea răspunsului imun, ci declanşează răspunsul imun numai acea grefă care are antigen de histocompatibilitate absent la receptor. Unele particularităţi individuale ca sexul, culoarea şi altele asemănătoare pot fi ignorate de sistemul de recunoaştere a receptorului.

b) *A doua lege,* aceea a hibrizilor de tip F1, derivă din legea precedentă şi prezintă un foarte mare interes în studiul biologiei transplantării organelor şi ţesuturilor. Hibrizii de tip F1, adică hibrizii rezultaţi din încrucişarea a două animale din linii pure diferite, acceptă grefe de la oricare din părinţi, în timp ce nici unul dintre părinţi nu acceptă nici o grefă provenind de la hibridul F1. Hibridul F1 acceptă de asemenea grefe de la alţi hibrizi de acelaşi tip. Prima generaţie de hibrizi (hibrizii F1) sînt deci „receptori universali" pentru o serie de donatori, descendenţi din cele două linii ale părinţilor sau descendenţi imediaţi ori mai îndepărtaţi ai încrucişărilor respective. Această

Scanned with OKEN Scanner

relaţie nu este însă reciprocă, homografa de piele a hibridului F1 fiind eliminată de animalele tuturor liniilor înrudite cu el.



Deoarece genele H sînt dominante, toate antigenele prezente la părinţi homozigoţi sînt prezente şi la hibrizii F1, ceea ce explică de ce ţesuturile de tip *AA* sau *BB* nu sînt străine hibridului F1 (de tip *AB*). Situaţia inversă nu are loc, pentru că hibridul posedă antigenele ambilor părinţi. Un receptor *AA* poate elimina un transplant *AB* de la hibridul F1 la fel de viguros ca şi un transplant *BB*. În practică, situaţia este însă mult mai complexă, ceea ce a justificat descrierea unei serii de excepţii de la legea hibrizilor de tip F1. Astfel, Prehn şi Main (38) au arătat că grefa de piele de la hibridul F1 (*AB*) este eliminată mai lent de părintele *AA* decît de celălalt părinte (*BB*). Celada şi Welstones (11) au demonstrat că hibrizii F1 pot elimina uneori grefele celulare de la părinţi, ceea ce înseamnă că antigenele părinţilor pot exista uneori sub o formă slabă la hibrizii F1. În acest caz, grefa de celule de la părinţi este eliminată la fel ca o grefă celulară străină. Teoretic este posibil ca hibrizii F1 să aibă şi unele antigene adiţionale faţă de părinţi, aşa cum s-a observat la păsări (28). Owen (33) a atras atenţia asupra unor date neconcordante cu legea enunţată, obţinute din experienţe pe porumbei, iepuri, oameni. De asemenea, studii pe şoareci (11, 13, 14, 46) au demonstrat că în unele cazuri celulele părinţilor sînt eliminate de hibrizii F1. Dar la aceşti hibrizi, care fac excepţie de la regulă, nu s-a stabilit dacă şi grefa de piele parentală este sau nu eliminată. Pe linia urmăririi unor antigene ale părinţilor la descendenţii F1 trebuie menţionat şi studiul lui Goodman (20). Acest autor a injectat un şoricel nou-născut, provenit din linia unuia dintre părinţi *(AA)*, cu celule de la un hibrid F1 şi l-a testat cînd a ajuns şoarece adult pentru eventuala toleranţă dobîndită faţă de grefa de piele prelevată de la un animal din linia genetică a celuilalt părinte al hibridului (*BB*). La fel cu şoarecele hibrid F1, care este tolerant din considerente genetice faţă de ţesuturile părinţilor săi, şoricelul provenit din linia unuia din părinţi este făcut tolerant prin injectarea sa imediat după naştere cu celule ale hibridului F1. El ar trebui să nu accepte grefa celulară sau de piele, dacă aceasta ar conţine antigene parentale *(BB)*, care nu s-ar fi transmis hibridului F1. Din patru linii parentale testate în acest mod (inducerea toleranţei la naştere prin administrarea unor celule ale hibridului de tip F1 şi aplicarea după 3 luni a unei grefe de piele sau injectarea unor celule splenice şi medulare de la celălalt părinte al hibridului F1) s-a obţinut o toleranţă de lungă durată pentru piele numai la două linii şi o toleranţă parţială la celelalte două. Toleranţa faţă de celulele splenice a fost bună în toate cele 4 cazuri, fapt demonstrat de apariţia himerismului celular şi a sindromului de *runt*, asupra căruia se va reveni în alt capitol. Şoarecii deveniţi toleranţi nu au produs nici hemaglutinine circulante, nici

Scanned with OKEN Scanner

anticorpi citotoxici, această lipsă de răspuns dovedindu-se specifică față de celulele hibridului F1 și ale celuilalt părinte al său. De fapt, cele patru linii genetice investigate (C57 BL/6 Cum, DBA/2 Cum și hibridul respectiv, C57 BL/Cum și C3H/Anf Cum și hibridul respectiv) nu s-au dovedit a avea antigene care să nu se găsească la hibrizii F1, iar celulele hibridului F1 s-au dovedit capabile să inducă toleranța față de toate antigenele unuia sau ale ambilor părinți.

c) *A treia lege* se referă la hibrizii de tip F2 și șoarecii încrucișați înapoi pe linie ascendentă (*backcross mice*). Ovulele și celulele spermatice ale hibrizilor diferă din punct de vedere genetic, pe cînd ale homozigoților sînt identice. Un hibrid simbolizat prin *AB* va avea ovulul sau celula spermatică fie de tip *A*, fie de tip *B*. Dacă țesuturile de la bunici (animale din linia *AA* sau linia *BB*) se transplantează la hibrizii F2 (a doua generație de hibrizi obținută prin încrucișarea hibrizilor F1 din prima generație), ele vor fi acceptate de 75% dintre ei (deoarece 75% dintre hibrizi au genele bunicilor *AA*, *AB*, *BA*) și eliminate de 25% dintre ei (deoarece 25% dintre hibrizi au genele bunicilor *BB*), conform legilor lui Mendel. Încrucișarea unui hibrid F2 cu unul dintre bunici (încrucișarea înapoi pe linie ascendentă) influențează comportamentul grefelor în felul următor: dacă șoarecii rezultați dintr-o astfel de încrucișare primesc un transplant de la un animal din linia bunicului cu care s-a făcut încrucișarea (de exemplu, din linia *AA*), acest transplant nu va fi eliminat, deoarece toți acești indivizi au și gena bunicului *AA*, indiferent dacă sînt homozigoți sau heterozigoți; dacă, dimpotrivă, acestor șoareci li se grefează piele de la celălalt bunic (*BB*), care nu a fost folosit în încrucișare, 50% dintrei ei vor elimina grefa (șoarecii din linia *AtA*), iar ceilalți 50% o vor tolera (șoarecii din linia *AB*). Aceste calcule sînt valabile, bineînțeles, numai cînd supraviețuirea transplantului depinde de o singură genă. Dacă sînt incriminate mai multe gene, acceptarea grefelor de la bunici de către generația a doua de hibrizi scade vertiginos. De exemplu, dacă în acceptarea sau eliminarea grefei sînt incriminați 15 *loci*, supraviețuirea grefei la generația F2 este de 10%. În cazul supraviețuirii homografei de piele la șoareci se pare că sînt implicați 15 *loci* (3). Aceeași situație are loc și cînd homografa este aplicată la hibrizi de tip R2, obținuți prin încrucișarea unui hibrid F1 cu unul din părinții săi. Cu alte cuvinte, numai la hibrizii de tip F1, homografele de piele parentală se comportă ca autografele de piele, pe cînd la hibrizii de tip F2 sau la cei de tip R2, aceste homografe sînt rejectate în cea mai mare parte.

d) *Legea liniilor coizogene* este cea de *a patra lege.* Deoarece liniile de șoareci diferă prin mai mulți *loci* H, eliminarea homotransplantului se poate datori antigenelor determinate de fiecare din acești *loci* și, probabil, combinării efectului diferiților *loci.* Dacă se cercetează efectul unui singur locus, *este* necesar să se folosească șoareci care diferă între ei doar printr-un singur *locus.* Asemenea animale au fost obținute de Snell (46), care le-a numit șoareci coizogeni sau „linii rezistente izogenic" (IR).

e) Cea de *a cincea lege* privește eliminarea grefei cu specificitate de sex. La animalele de linie pură, grefele de piele sînt rejectate, uneori, cînd donatorul este mascul și receptorul femel, prin acțiunea antigenică exercitată de cromozomul Y specific sexului masculin. Reacția este destul de slabă, asemănătoare cu incompatibilitatea la nivelul celor doi *loci* H-1 și H-3, grefele de

Scanned with OKEN Scanner

piele fiind rejectate în 3—4 săptămîni. Femelele și masculii aceleiași linii pure reprezintă, de fapt, linii IR naturale (care diferă printr-un singur *locus* H).

•

Rezultatele tuturor experimentelor făcute pe animale permit să se tragă unele concluzii și să se contureze unele ipoteze explicative ale fenomenelor semnalate. După Medawar (32), pe baza datelor existente pînă acum, se pot face unele considerații certe în privința comportamentului homografelor și a relațiilor dintre acest comportament și structura genetică a donatorului și a receptorului. Eliminarea unei homografe depinde de prezența în țesutul ei a unuia sau mai multor factori antigenici care lipsesc la gazdă. Prezența fiecărui antigen este determinată de prezența unei singure alele. Genele sînt „dominante" cînd își fac simțită prezența atît în stadiul de heterozigot, cît și în acela de homozigot, adică dacă se întîmplă sau nu ca alela să fie pereche cu o altă alelă similară în cromozomi. Homografele sînt tolerate între membrii aceleiași linii genetice, deoarece înrudirea strînsă stinge variația genetică și ei pot fi considerați ca identici și homozigoți pentru toate genele importante. Generația de hibrizi F1 este o populație uniformă, în sensul că membrii ei sînt genetic asemănători, dar după legile lui Mendel vor fi heterozigoți la nivelul fiecărei gene față de care liniile părinților lor diferă. De aici rezultă că hibrizii F1 conțin cel puțin cîte o reprezentanță din fiecare genă prezentă la fiecare din părinți și astfel se explică de ce ei sînt receptori universali. Cu cît este mai mare numărul de gene care controlează antigenele prin care se deosebesc cei doi părinți, cu atît mai mică este proporția de grefe reușite, cînd țesuturile părinților hibridului F1 se grefează la hibrizii de tip F2 sau R2. Două linii de animale, considerate pure din punct de vedere genetic, pot să se deosebească între ele printr-un număr de gene care controlează un anumit antigen puternic (de exemplu, acela care determină direct evoluția homografelor) sau pot să se deosebească printr-o serie de gene care controlează antigene slabe (în sensul că efectul lor poate fi evidențiat numai prin folosirea unor metode mai sensibile și că nu influențează direct timpul de supraviețuire a grefelor).

BIBLIOGRAFIE

1. Bailey D. W. — *Transplantation*, 1963, 1, 70.
2. Baner J. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 78.
3. Barnes A. D., Krohn P. L. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1957, 146, 505.
4. Batchelor J. R. — *Brit. med. Bull.*, 1965, 21, 100.
5. Billingham R. E., Sawchuck G. H., Silvers W. K. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1960, 46, 1 079.
6. Billingham R. E., Silvers W. K. — *Transplant. Bull.*, 1959, 6, 399.
7. Billingham R. E., Silvers W. K. — Ciba Foundation Symposium on Transplantation (G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron), Ed. Churchill, Londra, 1962, p. 90.
8. Bogden A. E., Aptekman P. M. — *Cancer Res.*, 1960, 20, 1 372.
9. Bogden A. E., Aptekman P. M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 97, 43.
10. Carkson P., Gorer P. A. — *Proc. roy. Soc. Med.*, 1956, 49, 117.
11. Celada F., Welstones W. J. — *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1962, 48, 326.
12. Craig J. V., McDermid M. — *Transplantation*, 1963, 1, 191.
13. Cudkowicz G. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1961, 107, 968.

Scanned with OKEN Scanner

14. Cudkowicz G. — *Fed. Proc.*, 1964, 23, 202.
15. Eichwald E. J. — *Advanc. biol. med. Phys.*, 1963, IX, 164.
16. Eichwald E. J., Silmser C. R. — *Transplant. Bull.*, 1955, 2, 148.
17. Frenzl B., Kren V., Stark O. — *Folia biol. (Praha)*, 1960, 6, 121.
18. Friedman E. A., Retan J. W., Marshall D. C., Henry L., Merill J. P. — *J. clin. Invest.*, 1961, 40, 2 162.
19. Gleason R. E., Fanguy R. C., Quinstenberry J. H. — *Poultry Sc.*, 1963, 42, 1 272.
20. Goodman J. W. — *Transplantation*, 1965, 3, 190.
21. Gorer P. A. — *J. Path. Bact.*, 1937, 44, 691.
22. Hancock D. M., Mullan F. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 99, 534.
23. Hildemann W. H. — *Immunology*, 1958, 1, 46.
24. Hildemann W. H., Haas R. — *J. Immunol.*, 1959, 83, 478.
25. Hildemann W. H., Haas R. — *J. cell. comp. Physiol.*, 1960, 55, 227.
26. Hildemann W. H., Haas R. — *Evolution*, 1961, 15, 267.
27. Hildemann W. H., Walford R. L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 56.
28. Irvin M. R., Cole L. J. — *J. exp. Zool.*, 1936, 73, 85.
29. Kallman K. D. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 10.
30. Kallman K. D., Gordon M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, 73, 599.
31. Kren V., Voseley P., Frenzl B., Stark O. — *Folia biol. (Praha)*, 1960, 6, 333.
32. Medawar P. B., Peer L. A. — Transplantation of Tissues (L. A. Peer), Ed. Williams-Wilkins, Baltimore, 1959, vol. 2, p. 49.
33. Owen R. D. — *J. med. Educ.*, 1959, 34, 366.
34. Paine R., Tripp M., Weigle J., Bodmer W., Bodmer J. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. biol.*, 1964, 29, 285.
35. Palm J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 97, 57.
36. Palm J. — *Transplantation*, 1964, 2, 603.
37. Pizzarello D. J., Wolsky A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 45.
38. Prehn R. T., Main J. M. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1954, 15, 191.
39. Rapaport F. T., Thomas L., Lawrence H. S., Converse J. M., Tillet W. S., Mullholland J. H. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 99, 564.
40. Rood J. J. van, Leuwen A. van — *J. clin. Invest.*, 1963, 42, 1 382.
41. Schierman L. W., Nordskog A. W. — *Science*, 1964, 137, 620.
42. Schierman L. W., Nordskog A. W. — *Science*, 1961, 134, 1 008.
43. Schierman L. W., Nordskog A. W. — *Transplantation*, 1965, 3, 44.
44. Snell G. D. — *J. Genet.*, 1948, 49, 87.
45. Snell G. D. — The Physiopathology of Cancer (F. Hamburger, W. H. Fishman), Ed. Harper-Hoeber, New York, 1953, p. 348.
46. Snell G. D. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1958, 21, 843.
47. Snell G. D., Bunker A. P. — *Transplantation*, 1965, 3, 235.
48. Snell G. D., Smith P., Gabrielson F. J. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1953, 14, 457.
49. Snell G. D., Stevens L. C. — *Immunology*, 1961, 4, 366.
50. Walford R. L., Anderson R. E., Carter P. K., Mihailovici F. — *J. Immunol.*, 1962, 89, 427.
51. Walford R. L., Gallagher R., Spaarda J. R. — *Science*, 1964, 144, 868.
52. Welshones W. J., Russel L. B. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1959, 45, 560.
53. Winn H. L., Stevens L. C., Snell G. D. — *Transplant. Bull.*, 1958, 5, 18.
54. Woodruff M. F. A., Robson J. S., Nolan B., Lambie A. T., Wilson T. I., Clark J. G. — *Lancet*, 1963, 2, 675.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL al III-lea

MECANISMELE IMUNOLOGICE ALE TRANSPLANTĂRII DE ORGANE ŞI ŢESUTURI

A. IMUNITATEA DE TRANSPLANTARE

1. INDUCEREA IMUNITĂŢII DE TRANSPLANTARE

După homotransplantarea unui ţesut la un animal normal, acesta prezintă o perioadă de latenţă imunologică, pe durata căreia grefa se comportă ca un autotransplant. Această perioadă de latenţă, în care homografa se comportă ca o autografă, este însă de scurtă durată (286) şi depinde în primul rînd de diferenţele imunologice dintre gazdă şi donator, adică de relaţiile lor genetice. Experimental, s-a putut realiza ca o homografă de piele efectuată între femelă şi bărbat, la şoareci din aceeaşi linie genetică, să supravieţuiască peste 30 de zile, avînd aspect de piele absolut normală, cu regenerarea stratului de păr. Spre deosebire de liniile pure, homografa încrucişată de piele între două bovidee sau doi iepuri, fără înrudire genetică între ei, se distruge în 7 zile. Un alt factor, secundar, care influenţează durata perioadei de latenţă imunologică după transplantare, este doza grefei, adică cantitatea de ţesut transplantat. În sfîrşit, în al treilea rînd, intervine reactivitatea imunologică a gazdei ca un factor individual, important, în declanşarea răspunsului imun.

Se poate afirma, deci, de la bun început, că imunitatea de transplantare este o imunitate dobîndită şi nu naturală.

În lucrări devenite clasice, Billingham şi colab. (59, 64) au urmărit reacţiile imunologice de transplantare, pe baza unor studii cantitative. Ei au stabilit că intensitatea reacţiei gazdei faţă de grefă poate fi apreciată prin timpul mediu de supravieţuire (TMS) a grefei, adică timpul care trece din momentul transplantării pînă la distrugerea completă a grefei la 50% din animalele de experienţă. Acest criteriu este asemănător cu LD_{50} folosită la titrarea toxinelor bacteriene. S-a demonstrat că homografele schimbate între membrii aceleiaşi linii genetice de animale se comportă ca autografe şi sînt tolerate la infinit. Incompatibilitatea apare în momentul schimburilor de ţesuturi sau organe între membrii unor sublinii genetice diferite. În cazul şoarecilor, lipsa de puritate genetică se observă chiar după 12 generaţii. Diferenţele de sex sau vîrstă (6 săptămîni—6 luni) nu prezintă practic importanţă, cu excepţia incompatibilităţii genetice legate de cromozomul Y, în cazul şoarecilor masculi.

După transplantarea pielii la şoareci diferiţi genetic, distrugerea grefei, o dată începută, se definitivează în 3—4 zile, iar TMS la aceste animale este

Scanned with OKEN Scanner

de 9—12 zile. Diferența de 3 zile (de la 9 la 12) se datorește variațiilor de tehnică și de asemenea variațiilor timpului de vascularizare și conexiune limfatică. În evoluția unei homografe se disting trei etape și anume: a) supraviețuirea tuturor celulelor din epiteliile țesutului grefat; b) distrugerea progresivă, dar incompletă, a epiteliilor țesutului grefat; c) distrugerea completă a epiteliilor țesutului grefat, cu lipsa oricăror celule epiteliale supraviețuitoare.

Eliminarea unei grefe de piele lasă gazda într-un stadiu înalt de rezistență, care la șoareci durează 120 de zile. În această perioadă, animalul are o rezistență crescută față de o eventuală a doua grefă de la același donator, pe care o elimină în mod accelerat (3—4 zile în loc de 9—12 zile). Acest fenomen este cunoscut sub numele de eliminare accelerată, eliminare de tip secundar sau eliminare de tip *second set*. Rezistența față de cea de a doua grefă de la același donator are caracterul unei imunizări active. Imunitatea activă de transplantare se poate transmite la alte animale, indemne, din aceeași linie genetică, prin transfer de celule izolate din ganglionii limfatici regionali, tributari grefei, celule splenice, leucocite și chiar extracte leucocitare. Acest fenomen a fost numit imunitate dobîndită prin adoptare (*adoptive acquired immunity*) și are un dublu caracter: este pasivă, în sensul că este de origine secundară, dar este și activă, în sensul că depinde de introducerea unor celule imunizate, active, de la primul animal gazdă, în organismul receptor, în care acestea au o activitate continuă și supraviețuiesc. Animalul care a primit un transfer de celule imune se deosebește de animalele imunizate pasiv prin faptul că este capabil să realizeze eliminarea accelerată a unei grefe de piele de la donatorul cu care s-a imunizat și celulele primei gazde. El se deosebește însă și de un animal imunizat activ, în mod obișnuit, prin faptul că nu dă niciodată un răspuns imun primar.

2. STIMULUL ANTIGENIC ȘI LOCUL REACȚIEI IMUNE PRIMARE

Natura antigenului responsabil de imunitatea de transplantare este o problemă care își așteaptă răspunsul de peste 50 de ani, pentru că acest antigen s-a dovedit extrem de nestabil și foarte dificil de extras și purificat. Genetic, s-a dovedit că antigenele de transplantare caracteristice pentru fiecare individ în parte sînt numeroase și se află sub un control genetic riguros, dar, din păcate, identificarea lor prin metodele genetice cunoscute nu este posibilă. Medawar (400) a formulat primele particularități ale antigenelor de transplantare: capacitatea sîngelui de a declanșa și întreține reacția față de o homografă ține exclusiv de leucocite și limfocite și lipsește total din celulele anucleate, iar antigenele caracteristice unui individ se găsesc în toate țesuturile nucleate viabile ale corpului și sînt aceleași indiferent de țesut sau organ.

Primele încercări de separare a antigenelor de transplantare au fost făcute de Billingham și colab. (61), care au arătat că, după dezintegrarea celulelor, substanța antigenică rămîne concentrată în nucleu. Natura chimică exactă a antigenelor de transplantare nu a putut fi însă stabilită cu precizie pînă acum; asupra cunoștințelor actuale în legătură cu această problemă se va reveni într-o secțiune următoare a acestui capitol, consacrată antigenelor de transplantare.

În ceea ce privește locul primar al reacției față de homografă, s-a putut demonstra cu precizie că acesta este în ganglionii limfatici regionali (400).

Scanned with OKEN Scanner

Printr-o serie de experienţe ingenioase, Mitchinson (425) a evidenţiat posibilitatea transferării de la un animal la altul, cu ajutorul celulelor ganglionilor regionali, a unei stări de sensibilitate, imunitate sau rezistenţă crescută faţă de grefele de tumori. Aceste date au fost confirmate şi în cazul grefelor de piele la iepuri, subliniindu-se rolul posibil al splinei ca participant la proces (59). Transferarea imunităţii prin adoptare (425) a constituit un argument deosebit de important asupra naturii imunologice a reacţiei la homografă şi asupra faptului că locul reacţiei primare imune este ganglionul regional (501). Scothorne şi McGregor (531) au arătat că atunci cînd intră în contact cu stimulii proveniţi de la homografă, ganglionii limfatici regionali suferă exact aceleaşi transformări histologice şi citologice care se constată în cazul formării de anticorpi în cel mai tipic sistem imunologic.

3. SPECIFICITATEA IMUNITĂŢII DE TRANSPLANTARE

Teoria imunităţii active de transplantare a ţesuturilor trebuie să demonstreze, pentru a putea fi acceptată, că o a doua grefă de la acelaşi donator se dezintegrează mai rapid decît prima grefă, ca dovadă a existenţei unei stări de sensibilizare la animalul-gazdă. Folosind homografele de piele la iepuri, Medawar (393) a demonstrat că eliminarea accelerată a celei de a doua grefe se produce ca urmare a stării de imunitate a receptorului. Această stare de imunitate, care se instalează la un animal după ce i s-a aplicat o grefă şi care duce la eliminarea acesteia, face ca el să rămînă refractar faţă de donatorul de grefă. Starea de imunitate indusă astfel persistă mai multe luni.

Snell (558), transplantînd homografe între membrii unei linii pure de şoareci, care genetic s-au deosebit printr-o singură genă purtătoare a unui singur antigen (transplant mascul-femelă), a demonstrat că reacţia imună la transplantare este o reacţie specifică de individ. Datele experimentale actuale nu au reuşit să pună în evidenţă existenţa unei specificităţi imunologice legate de ţesut sau de originea embriologică. Este paradoxal că acest fapt s-a constatat nu prin reacţii încrucişate de imunitate dobîndită, ci prin urmărirea reacţiilor încrucişate de inducere a toleranţei faţă de grefe (371). Fenomenul este interesant şi merită a fi exemplificat. Este adevărat că, injectînd animale adulte cu leucocite de la un donator, Medawar şi Sparrow (401) au obţinut imunizarea lor faţă de grefe ulterioare de piele de la acelaşi donator, dar acest fapt nu dovedeşte cu siguranţă decît că pielea şi leucocitele unui individ au antigene comune, deci au specificitate de individ. Lipsa specificităţii de ţesut a răspunsului imun reiese clar dacă se injectează animale foarte tinere (nou-născuţi) cu leucocite de la donator, în felul acesta obţinîndu-se toleranţa lor faţă de grefa de piele a aceluiaşi donator. Inducerea toleranţei cu ajutorul leucocitelor faţă de grefa de piele nu se poate explica decît dacă se admite că pielea nu conţine alte antigene decît acelea prezente în leucocit, deci dacă se admite lipsa unei specificităţi antigenice legate de ţesut.

Acest postulat este susţinut de numeroase alte date experimentale. Astfel, Woodrooff şi Sparrow [citaţi de (400)] au constatat că splina transplantată la şobolani nou-născuţi face ca ei să accepte mai tîrziu homografa de tiroidă. Şoareci injectaţi imediat după naştere cu celule splenice (401) devin toleranţi

la grefe de țesut medulosuprarenalian. Dacă acesta ar conține antigene diferite față de splină, toleranța nu ar putea fi conferită cu ajutorul homotransplantului splenic sau al splenocitelor.

În concluzie, imunitatea specifică de individ este condiționată de particularitățile constituționale ale antigenelor incriminate în reacția imunologică de transplantare. Ea pare a fi o caracteristică a tuturor celulelor unui individ sau, în orice caz, a tuturor celulelor nucleate, viabile.

4. NATURA IMUNITĂȚII DE TRANSPLANTARE

A spune despre eliminarea unei homografe că este o reacție imunologică este prea puțin. Este foarte important să se stabilească tipul acestei reacții imunologice.

Privită în linii mari, reacția imunologică la homografă este conformă unui model de reacție imunologică clasică. Rezistența la homografă se creează în mod activ și nu este naturală sau congenitală. Viteza cu care rezistența la homografă se instalează și intensitatea acestei rezistențe depind nemijlocit — după cum s-a menționat — de gradul de diferență dintre specii, de cantitatea țesutului grefat și de timpul necesar stimulilor antigenici pentru a ajunge la centrii care declanșează răspunsul imunologic. În eliminarea homografei, receptorul realizează o stare refractară, de o rezistență specială, care face ca o a doua grefă de la același donator să se elimine mai violent și mai rapid. Această stare refractară nu este localizată la nivelul homografei, ci cuprinde toate regiunile organismului accesibile vaselor sanguine (400). Însă, cu cît reacția la homografă este examinată mai îndeaproape, cu atît apar diferențe față de modelul clasic imunologic. În primul rînd frapează durata mare de timp a sensibilizării indusă de transplantarea unei homografe solide, iar în al doilea rînd faptul că anticorpii circulanți nu iau parte în mod evident și direct la reacția de distrugere a homografei. Asupra anticorpilor circulanți din reacția imunologică de transplantare se revine într-o altă secțiune a acestui capitol. Reacția de eliminare a homografelor se apropie prin particularitățile sale de reacția la tuberculină și, în general, de reacțiile de hipersensibilitate de tip întîrziat. Ea este o reacție mediată nu de anticorpi serici, ci, în primul rînd, de celule activate imunologic. Metodele prin care s-a realizat transferul adoptiv al imunității de transplantare sînt analoge metodelor de transferare a alergiei la medicamente și a hipersensibilității la tuberculină. Imunitatea de transplantare, ca și hipersensibilitatea de tip întîrziat, este sensibilă la acțiunea hormonilor din familia cortizonului și aparent neinfluențată de medicamentele antihistaminice. Atît imunitatea de transplantare, cît și hipersensibilizările de tip întîrziat sînt abolite prin iradieri extensive cu raze Röntgen, datorită acțiunii acestora asupra sistemului limfatic.

Brent, Brown și Medawar [citați de (400)] au arătat că imunitatea de transplantare la cobai poate fi făcută să se manifeste ca o reacție de hipersensibilitate cutanată de tip întîrziat. Dacă antigenul extras din țesuturile donatorului se injectează intradermic la un cobai sensibilizat cu o homografă de piele a aceluiași donator, la locul injecției apare o inflamație de tipul reacției la tuberculină. Reacția este transferabilă la un alt cobai indemn cu ajuto-

Scanned with OKEN Scanner

rul celulelor limfatice sensibilizate prin grefa de piele inițială, dar nu și cu ajutorul serului imun. Favour (194) a subliniat analogia dintre alergia tuberculoasă și imunitatea de transplantare, prin prezența limfocitului în ambele procese. Singura celulă care este comună diferitelor forme de alergie tuberculoasă este limfocitul, a cărui apariție în cantitate mare într-un focar tuberculos coincide cu instalarea alergiei tuberculoase. De asemenea, apariția procesului distructiv în homografă coincide cu apariția limfocitelor în acest loc. Datorită mediului fluid al receptorului, homografele supraviețuiesc suficient timp pentru a se putea elimina consecințele traumatismului chirurgical. Cînd grefele sînt invadate de limfocitele receptorului, se poate presupune că alergia a fost transferată prin ele, pasiv, la grefă. Cum grefa este sursa de antigene sensibilizante, ea trebuie să sensibilizeze în primul rînd receptorul. De regulă, această sensibilizare durează mai multe zile și poate fi prelungită experimental prin administrare de steroizi sau prin iradiere cu raze Röntgen în aceeași manieră în care alergia tuberculinică poate fi suprimată prin aceste tratamente. Asemănările enumerate mai sus, între reacția imunologică la homografă și hipersensibilitatea de tip întîrziat permit să se afirme că ambele procese depind de activarea, dezvoltarea și angajarea în periferie a celulei limfatice.

Din păcate nu se pot face alte precizări, deoarece cunoștințele noastre asupra funcțiilor și proprietăților limfocitului normal sînt încă destul de reduse. Reacțiile imunologice care sînt declanșate de celulele mononucleare sanguine din seria limfocitară se pot evidenția ca reacții inflamatoare cutanate de tip întîrziat, în opoziție cu anticorpii celulari. Aceste reacții cutanate sînt utilizate ca metode simple și comode de investigație a așa-numitei imunități celulare (84), care include și reactivitatea la homografă. Dintre animalele de experiență reacționează în acest mod cobaiul și iepurele, precum și omul (73, 86, 179, 402), specii la care inocularea intradermică a celulelor omologe viabile de la același donator la receptori care au eliminat o grefă de piele provoacă o reacție inflamatoare locală extrem de violentă. Recent s-a demonstrat că un animal care prezintă acest tip de reacție este de asemenea hamsterul sirian (73, 86). La acesta, hipersensibilitatea răspunzătoare de reactivitatea dermică, desemnată cu numele de reacție directă, poate fi transferată prin adoptare la alte gazde, numai cu ajutorul celulelor limfatice vii, nu și prin ser. Dacă celulele limfatice activate imunologic de la gazdele sensibilizate specific sînt inoculate intradermic la animale din linia genetică a donatorului de homografă, rezultă o reacție tipică de transfer, care este expresia locală a stării activate a acestor celule. Reacția de hipersensibilitate dermică este intersantă de urmărit și de investigat, pentru că ea este expresia aceluiași răspuns imunologic, ca și imunitatea de transplantare (491). De altfel, investigația hipersensibilității de tip întîrziat și legătura ei cu imunitatea față de homografă au constituit obiectul unor numeroase studii *in vitro* (158, 467, 587, 637).

În continuare redăm un model experimental de urmărire *in vitro* a reacției de hipersensibilitate întîrziată și a corelației sale cu imunitatea la homografă, folosit de David și colab. (158) într-un studiu asupra acestei probleme, pe baza unei metode descrise anterior (223). Pe scurt, celule de exsudat peritoneal provocat la cobai cu ajutorul uleiului mineral au fost recoltate, spălate și plasate în medii de cultură. Aceste celule au fost apoi centrifugate în

Scanned with OKEN Scanner

tuburi capilare, iar porţiunea din tub care conţinea depozitul celular a fost tăiată şi pusă în camere Hackaness. Camerele au fost umplute cu mediu de cultură pentru ţesuturi, cu şi fără antigen inclus în el (mediul de cultură fără antigen servind ca probă de control) şi apoi închise. Astfel pregătite, aceste camere au fost incubate 24 de ore la 37°, timp în care celulele au migrat în cameră în afara tubului capilar. Suprafaţa de migrare a fost proiectată şi măsurată cu un planimetru, rezultatele calculîndu-se după o formulă care apreciază în procente migrarea celulelor sensibilizate în comparaţie cu cele nesensibilizate, luate ca probă de control.

Dintre rezultatele obţinute prin acest model experimental ingenios semnalăm următoarele: a) s-a observat că migrarea celulelor de exsudat peritoneal provenite de la cobaii care prezintă o hipersensibilitate de tip întîrziat faţă de unele substanţe (tuberculină, ovalbumină şi toxoid difteric) este puternic inhibată de prezenţa în mediul de cultură a antigenelor respective şi că această inhibiţie este specifică; b) celulele de cobai, care, din contra, produc anticorpi circulanţi, nu sînt inhibate de antigenele respective în aceleaşi condiţii experimentale; c) serul animalelor de experienţă, care se află în stare de hipersensibilitate, sau serul cu anticorpi precipitanţi nu provoacă nici un efect de sensibilizare a celulelor normale la antigenele menţionate; d) acest sistem *in vitro* poate fi extins la abordarea problemei imunităţii la homografă şi la determinarea antigenelor homografelor. Astfel, în patru experienţe realizate cu ajutorul acestui sistem a survenit o reacţie specifică între celulele unui şoarece sensibilizat cu grefă de piele şi antigenul complet celular izolat de la un animal din linia genetică a donatorului. Cum antigenele în acest caz au fost celule întregi, inhibarea migrării celulelor peritoneale poate fi explicată fie prin faptul că celulele sensibile au fost inhibate de antigen, ca în cazul reacţiilor de hipersensibilitate discutate mai sus, fie prin faptul că celulele-antigene, acţionînd ca celule marcate, au fost distruse de celulele sensibile. Nu este exclus ca în acest proces să intervină ambele mecanisme.

5. RĂSPUNSUL IMUN

Răspunsul imun care duce la eliminarea grefei este precipitat de pătrunderea celulelor grefei străine în organismul gazdei. În funcţie de tipul de celule şi calea de pătrundere, unele produse ale grefei ajung la centrii imunogeni ai gazdei. În cazul unei grefe ortotopice de piele, o cantitate foarte mică, dacă nu chiar nulă, de celule ajunge la centrul imunogen cel mai apropiat, ganglionul limfatic regional (530). O cantitate mică din materialul subcelular derivat din celulele grefei situate în apropierea patului grefei pot pătrunde prin spaţiile libere din ţesutul gazdei în lichidul interstiţial şi pot fi astfel duse pe cale limfatică la ganglionii regionali. Aceste materiale subcelulare conţin antigene, faţă de care centrii imuni reacţionează. În cazul injectării intravenoase a celulelor limfatice, toţi centrii imunogeni (splină, ţesut limfatic) vin în contact direct cu celulele întregi sau dezintegrate ale grefei, o sursă bogată de antigen, care poate da reacţii foarte variate în funcţie de condiţiile respective. Ca rezultat al acestor reacţii apar anticorpi specifici pe/celulele imune proliferante ale gazdei şi în serul acesteia (184). Celulele imune tind să se grupeze în vecinătatea grefei. Activitatea lor specifică, cu sau fără ajutorul

Scanned with OKEN Scanner

anticorpilor serici, afectează grefa şi dacă acţiunea lor este suficient de puternică, ele provoacă moartea grefei prin citoliză directă sau prin intermediul revascularizării şi vascularizării sale (184). De obicei, eliminarea grefei nu este totală, unele antigene sau celule aparţinînd grefei putînd persista în gazdă. Chiar o eliminare totală a unei homografe de piele lasă la locul său de grefare o rămăşiţă incomplet definită încă, deoarece plasarea unei a doua grefe de piele de la acelaşi donator într-un alt loc de pe suprafaţa corpului receptorului dă reacţii inflamatoare anamnestice la locul primei grefe (aşa-numita *recall flare* a autorilor anglo-saxoni), care poate fi explicată dacă se admite că pe locul respectiv s-a reţinut de către ţesuturile receptorului o cantitate oarecare de antigen după eliminarea primei grefe (184). Tot în legătură cu condiţiile de apariţie a răspunsului imun, Medawar (395) a demonstrat că imunizarea specifică a unui iepure faţă de pielea unui anumit donator, urmată de efectuarea unui transplant de piele de la acelaşi donator, în camera anterioară a ochiului receptorului, duce la eliminarea acestei ultime grefe numai după ce ochiul a fost invadat de vase sanguine de neoformaţie la locul respectiv. Astfel, Medawar trage concluzia că implantele de ţesut în ochi nu depind de un aport sanguin pentru a putea supravieţui şi că staza vasculară nu este legată direct de eliminarea homografei de piele.

Cu multă probabilitate, prima grefă devine întîi bine vascularizată în patul receptorului şi abia după aceea urmează procesul de dezintegrare şi eliminare. După Dempster (169), homotransplantele renale dau semne de dezintegrare înainte ca aportul sanguin să diminueze. Pe de altă parte, vasele sanguine transplantate de la embrion la adult nu sînt capabile să provoace un răspuns în anticorpi.

Dempster (169) a emis ipoteza că provocarea răspunsului în anticorpi variază considerabil cu locul plasării transplantului în organismul gazdei: pielea determină cel mai puternic antagonism faţă de homografe, în timp ce orbita, creierul şi camera anterioară a ochiului sînt deosebit de favorabile ca loc de implantare. Răspunsul imun şi deci timpul de supravieţuire a grefei sînt condiţionate de asemenea de alţi factori. De exemplu, dacă grefa este mică şi eliberează o cantitate redusă de antigen, supravieţuirea ei poate fi prelungită. Răspunsul imun este minim, chiar dacă grefa este plasată într-un loc unde infiltraţia celulară se instalează cu greutate (creier, ochi) şi unde antigenele au un ritm lent de difuzare din zona grefei. Atît timp cît limfocitele au posibilitatea de a invada grefa există riscul eliminării ei de către receptor, viteza şi intensitatea acestui proces depinzînd de factorii locali existenţi. Dacă grefa este astfel plasată încît să nu stimuleze un răspuns celular, persistenţa ei devine posibilă. Pe de altă parte, orice cauze care stimulează inflamaţia în sine (traumatismul, infecţia, prezenţa unor corpuri străine la locul transplantării) favorizează instalarea mai rapidă şi mai intensă a eliminării grefei, care evoluează în etape (fig. 30). De asemenea, viteza de sensibilizare a gazdei şi declanşarea răspunsului imun din partea acesteia depind de organul sau ţesutul transplantat şi de locul de transplantare (184). Astfel, în cazul homografei de piele de ureche la iepure, primele modificări în ganglionii limfatici regionali apar după 2 zile (337), în timp ce după transplantarea unui rinichi, sensibilizarea gazdei se produce în următoarele 2—24 de ore.

Scanned with OKEN Scanner

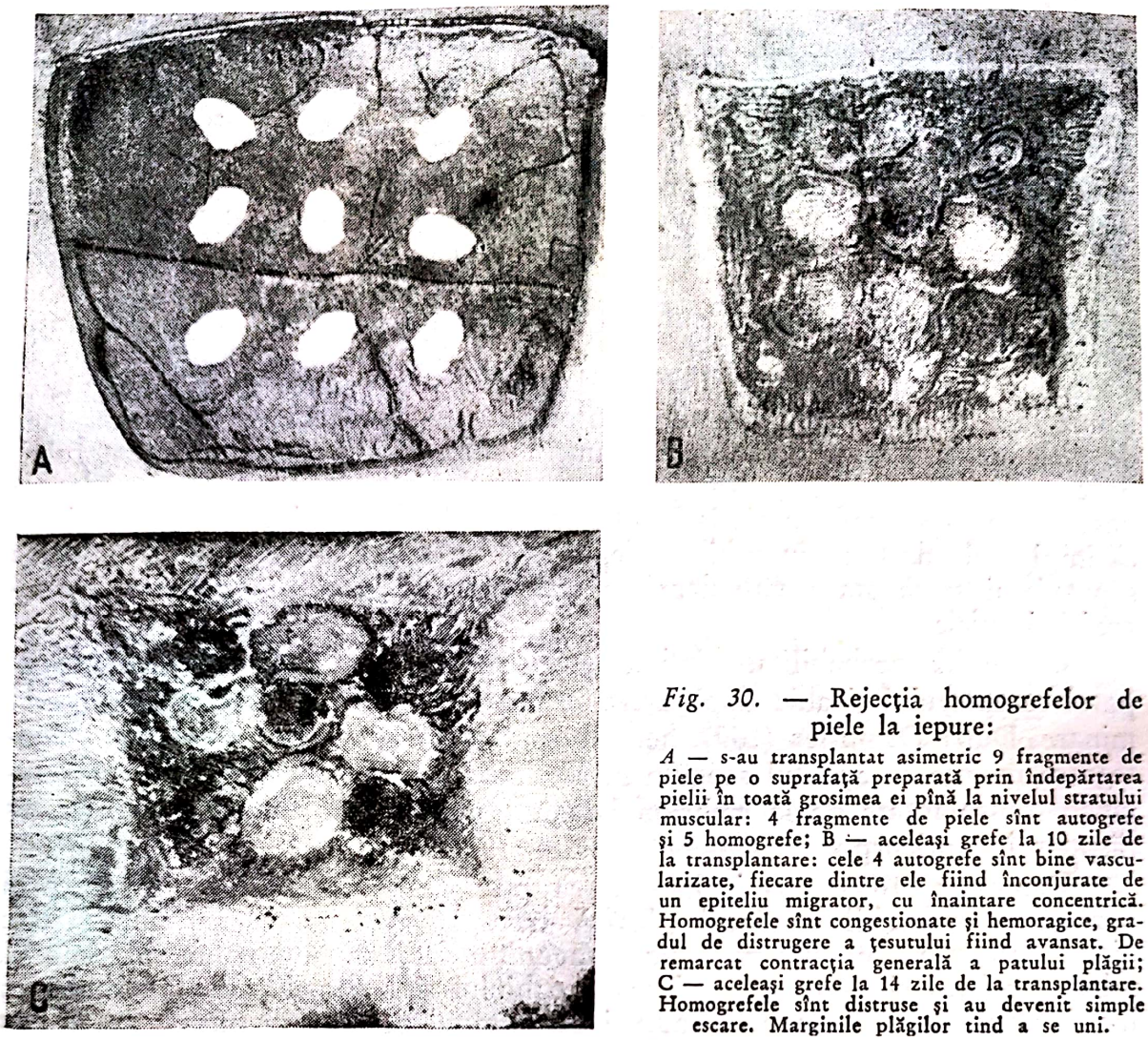


Fig. 30. — Rejecția homografelor de piele la iepure:

A — s-au transplantat asimetric 9 fragmente de piele pe o suprafață preparată prin îndepărtarea pielii în toată grosimea ei pînă la nivelul stratului muscular: 4 fragmente de piele sînt autografe și 5 homografe; B — aceleași grefe la 10 zile de la transplantare: cele 4 autografe sînt bine vascularizate, fiecare dintre ele fiind înconjurate de un epiteliu migrator, cu înaintare concentrică. Homografele sînt congestionate și hemoragice, gradul de distrugere a țesutului fiind avansat. De remarcat contracția generală a patului plăgii; C — aceleași grefe la 14 zile de la transplantare. Homografele sînt distruse și au devenit simple escare. Marginile plăgilor tind a se uni.

În acest caz, legăturile vasculare grefă-gazdă se stabilesc intraoperator, iar calea limfatică, mai lentă, pare a avea un rol secundar în transportul antigenelor (303).

6. CAZURI SPECIALE DE IMUNITATE

În general, homografele între două mamifere adulte normale, neînrudite genetic și netratate în prealabil, nu sînt acceptate niciodată. Dar cum în biologie afirmațiile categorice sînt de obicei infirmate de numeroase excepții, și în acest caz, Adams și colab. (2) au descoperit faptul remarcabil că la hamster homografa de piele are o perioadă de supraviețuire mult mai lungă decît la orice animal. Acest exemplu nu a putut fi explicat cauzal pînă acum. În afară de acesta, există încă o serie de cazuri speciale de supraviețuire îndelungată a homografelor. Aceste cazuri pot fi împărțite în trei categorii (400): a) supraviețuire datorită incapacității grefei de a provoca imunitatea; b) supra-

Scanned with OKEN Scanner

vieţuire prin incapacitatea grefei de a răspunde la o anumită stare de imunitate; c) supravieţuire datorită unor cauze necunoscute pînă acum.

a) **Incapacitatea grefei de a provoca imunitatea.** O homogrefă poate să nu dea o reacţie imunitară, dacă este transplantată într-o regiune a corpului în care proprietăţile antigenice nu se pot manifesta, cum se întîmplă, de exemplu, în creier. Supravieţuirea grefei în creier nu mai are loc însă dacă gazda a fost în prealabil imunizată cu o altă grefă de la acelaşi donator, plasată într-o regiune a corpului unde stimulul antigenic se poate exercita. Supravieţuirea grefei în creier se datoreşte, deci, incapacităţii ei de a declanşa un răspuns imun şi nu eventualităţii de a fi inaccesibilă consecinţelor unei reacţii imunologice. Acest fapt devine explicabil dacă se ţine seamă de lipsa unui sistem de drenaj limfatic al acestui organ. Însă, în clinică, grefele plasate în creier nu au avut aplicabilitate.

Succesul folosirii segmentelor de vase sanguine ca homografe se explică prin faptul că funcţionalitatea lor nu este legată de supravieţuirea lor. Homografele vasculare, conservate prin îngheţare şi desicate şi folosite după dezgheţare, sînt la fel de bune ca şi cele proaspete, cu toate că ele nu mai sînt viabile în acest caz şi şi-au pierdut puterea antigenică. Partea utilă la o asemenea grefă este endoscheletul ei fibros, iar dovada acestei afirmaţii o face faptul că ele au putut fi înlocuite cu succes cu proteze vasculare din materiale plastice.

b) **Incapacitatea grefei de a răspunde unei stări de imunitate.** Cea mai interesantă excepţie de la regulile imunităţii de transplantare este oferită de homografa de cornee. Ţesutul cornean, ca atare, nu are nimic anormal din punct de vedere imunologic. Billingham şi Silvers (70) au arătat că transplantînd heterotopic o homografă de cornee pe o suprafaţă anterior ocupată de piele, ea se comportă exact ca o grefă de piele. Ceea ce face deosebită comportarea grefei ortotopice de cornee este situaţia ei anatomică. Aceşti autori (70) au arătat că un homotransplant de piele plasat în cornee are o perioadă foarte lungă de supravieţuire, chiar dacă animalul a fost în prealabil puternic imunizat faţă de donatorul respectiv, cu ajutorul unei alte grefe de piele plasată în poziţie ortotopică.

Cazul homografei de cornee pare a fi opus cazului homografelor de ţesuturi plasate în creier. Homografele în creier supravieţuiesc pentru că nu pot provoca imunitate, în timp ce homografa de cornee supravieţuieşte pentru că nu poate răspunde reacţiei imunologice. Aşa cum s-a arătat şi într-un capitol precedent, homografa corneană supravieţuieşte la un animal imunizat faţă de ţesuturile donatorului de cornee numai atîta timp cît rămîne avasculară. Acelaşi lucru este valabil şi pentru pielea transplantată în camera anterioară a ochiului. Homografele de cartilaje vii pot supravieţui nu numai într-un receptor imunizat, ci chiar în mijlocul leziunii inflamatoare care însoţeşte distrugerea altor homografe din imediata vecinătate. O explicaţie posibilă, deşi nu pe deplin satisfăcătoare, ar fi lipsa de vascularizaţie a cartilajului, acesta comportîndu-se ca o cultură de ţesut *in vivo* (400).

c) **Supravieţuirea grefei datorită unor cauze necunoscute.** În această categorie au fost introduse grefele endocrine şi grefele nervoase. Deşi, în general, grefele endocrine urmează legile generale ale transplantării, totuşi, uneori,

Scanned with OKEN Scanner

ele supravieţuiesc îndelung, mai ales dacă diferenţele genetice donator-receptor nu sînt foarte mari. La şobolance cu ovarectomie, grefele de ovar supravieţuiesc peste 2 luni, în timp ce grefa de piele la aceeaşi combinaţie donator-receptor se elimină în maximum 21 de zile (68). Dacă grefa de ovar se execută la un animal imunizat în prealabil cu piele de la acelaşi donator, durata de supravieţuire scade.

Homografele de segmente scurte de nervi periferici sînt adesea reuşite la animale mici ca iepuri, şobolani, în sensul că permit o restaurare, chiar numai parţială, a funcţiei musculare. La om, rezultatele au fost mai puţin încurajatoare, în special din cauza lungimii segmentului nervos, care trebuie folosit adesea, ceea ce constituie inconvenientul major al acestui transplant şi explică în parte şi eşecul său (400).

B. ANTIGENELE DE TRANSPLANTARE

1. GENERALITĂŢI

Impedimentul major în problema transplantării organelor şi ţesuturilor este, în mod categoric, intoleranţa gazdei faţă de homografă şi reacţia consecutivă de eliminare a transplantului. Este normal deci ca prima întrebare să fie: în ce constă natura şi mecanismul intoleranţei? Datele experimentale existente au făcut ca, în prezent, toţi cercetătorii să admită că reacţia de transplantare intră în cadrul foarte complex al imunităţii, deoarece grefa aduce cu ea antigene determinante. Ca urmare, majoritatea lucrărilor din acest domeniu pivotează în jurul reacţiei antigen-anticorp, indiferent de aspectul urmărit al problemei. Natura antigenului sau a antigenelor de transplantare este una dintre problemele cheie ale biologiei transplantării.

În ultimii ani s-au făcut nenumărate studii asupra localizării, specificităţii şi naturii chimice a antigenelor de transplantare. Aceste studii au fost întreprinse în special pe şoareci, animale mai uşor de manipulat şi bine cunoscute din punct de vedere imunogenetic, în comparaţie cu alte specii. Acest avantaj compensează parţial faptul că la şoareci cantitatea de ţesut disponibilă pentru investigaţii este foarte mică faţă de alte animale. Cum reacţiile imunologice cele mai puternice s-au întîlnit, aşa cum s-a arătat în capitolul precedent, în sistemul genetic H-2, majoritatea cercetărilor s-au referit la acest sistem. Însă, pentru a se urmări în mod exclusiv reacţiile provocate de sistemul genetic H-2 au fost necesare linii coizogene de şoareci, adică animale care să se deosebească între ele numai prin *locus* H-2. Aceste linii genetice de şoareci s-au realizat cu multe dificultăţi. De aceea, în general, s-au folosit în cercetare mai ales linii de şoareci care în mod sigur au avut un *locus* H-2 diferit, ignorîndu-se alte diferenţe genetice dintre ei şi presupunîndu-se că acestea sînt mai puţin eficiente decît diferenţa de *locus* H-2.

S-a încercat în mod insistent să se izoleze antigenul de transplantare şi să se identifice din punct de vedere chimic. S-a cercetat antigenicitatea ţesuturilor şi a organelor, a celulelor izolate, a fragmentelor celulare, a extractelor celulare solubile şi insolubile şi a preparatelor obţinute prin diferite metode de extragere chimică. Pentru a se putea aprecia puterea lor antigenică s-a con-

Scanned with OKEN Scanner

siderat necesară existența unor metode de detectare a antigenicității și de stabilire a calității de antigen a acestor produse. Medawar (397) a arătat că, pentru analiza antigenelor de transplantare, se pot folosi numai metode biologice și că acestea sînt: a) capacitatea preparatelor antigenice de a induce toleranța față de țesuturile transplantate (metoda este însă de lungă durată și insuficient de accesibilă cantitativ pentru folosirea ei sistematică în special în cazul extraselor celulare); b) capacitatea preparatelor antigenice de a produce o reacție de hipersensibilizare cutanată (din păcate însă reacțiile de hipersensibilizare cutanată sînt la discreția unor agenți care pot provoca reacții nespecifice); c) capacitatea preparatelor antigenice de a declanșa imunitatea de transplantare, adică de a condiționa receptorul astfel încît acesta să dea un răspuns imunologic de tip secundar cînd este pus în contact cu o homografă de la același donator de la care s-a preparat antigenul testat. Metoda s-a dovedit simplă, sensibilă și specifică și se practică în prezent pe scară largă în studiile de identificare a antigenului de transplantare. Această metodă constă din următoarele operații: preparatul antigenic de testat se injectează unui animal receptor căruia, după 3 zile, i se aplică o homografă de piele prelevată de la același donator și se urmărește dacă grefa este eliminată într-un timp mai scurt în comparație cu grefa de control. Acesta este fenomenul de eliminare accelerată a grefei, ca urmare a declanșării răspunsului imun de către gazdă prin administrarea prealabilă a aceluiași antigen (63, 80, 283, 368). Timpul necesar pentru executarea acestui test de antigenicitate este totuși considerabil.

O serie de lucrări ulterioare (91, 348) au permis abordarea problemei determinării puterii antigenice a țesuturilor și preparatelor tisulare dintr-un punct nou de vedere. S-a observat că injectarea prealabilă la șoareci a unor suspensii de celule splenice, timice și epidermice sau a unor extracte din aceste celule este capabilă să provoace nu numai eliminarea accelerată a unei homografe de piele practicată cîteva zile mai tîrziu, ci și apariția unor anticorpi circulanți serici cu activitate hemaglutinantă. Aceste hemaglutinine pot fi inhibate specific de diferite preparate conținînd antigene de transplantare, confirmate prin testul pozitiv al eliminării accelerate (91, 348). Cum rezultatele reacției de hemaglutinoinhibare și acelea ale reacției de tip secundar sînt concordante, s-a propus folosirea hemaglutinoinhibării, după tehnica lui Gorer și colab. (245, 246), în determinarea puterii antigenice a diverselor preparate tisulare. Explicația acestei concordanțe constă în faptul că, la șoareci, animalele cu care s-a lucrat foarte mult, atît antigenele de transplantare, cît și hemaglutinogenele corespunzătoare, sînt condiționate de aceleași gene. Nu există încă teste definitive care să permită identificarea completă a celor două entități.

Astfel, preparatele antigenice au putut fi investigate sub două aspecte: a) puterea lor sensibilizantă, ceea ce înseamnă capacitatea lor de a provoca eliminarea accelerată a homografei ulterioare de piele și b) puterea lor inhibitoare, ceea ce înseamnă capacitatea lor de a inhiba hemaglutinarea.

În ultimul timp s-au mai folosit și alte metode, ca imunofluorescența, pentru determinarea capacității antigenice a preparatelor tisulare (427) și fenomenul de favorizare a creșterii tumorilor (316).

Scanned with OKEN Scanner

În general, rezultatele obținute în studiul antigenelor de transplantare au fost diferite, în funcție de metodele folosite pentru izolarea lor. Diferența dintre aceste metode a fost creată de asemenea de aspectul răspunsului imun care a fost testat. Astfel, antigenele purificate din tumoarea BP8 la șoareci din linia C3H (163) produc o inhibiție puternică a hemaglutinării, induc formarea de hemaglutinine la acest animal și provoacă eliminarea accelerată a grefei de piele după injectare la șoareci din linia A sau din linia Balb/c în doză de 100 μg (18,167). Însă, antigenul preparat din tumoarea CL2 la șoarecii din linia Balb/c produce numai o inhibiție marcată a hemaglutinării (167), fără a provoca și eliminarea accelerată a grefei de piele (166). Produsul similar din tumoarea SA-1/Ajax nu produce nici inhibiția hemaglutinării și nici eliminarea accelerată, dar este un inductor eficient al formării hemaglutininelor în serul animalelor (166). Diversitatea rezultatelor obținute, mai ales în primele studii, a pus problema existenței mai multor antigene de transplantare și anume: un antigen care ar fi responsabil de eliminarea grefei de piele (T); un altul responsabil de producerea hemaglutininelor (H) și un al treilea care ar provoca fenomenul de potențare tumorală (315). S-a emis de asemenea ipoteza că grupările determinante ale antigenelor sînt identice și că diferența dintre antigene ar apărea numai la nivelul grupărilor prostetice subsidiare. Astăzi se admite, în general, existența antigenelor multiple de transplantare, condiționate histogenetic, fără a se putea delimita însă strict efectul lor asupra unui singur fenomen (eliminare, producere de hemaglutinine sau facilitare tumorală). Evidențierea cu preponderență a unuia dintre aceste efecte ține de metoda folosită (183). După Davies (166), important este faptul că antigenele de histocompatibilitate, transplantare și facilitare tumorală poartă aceeași specificitate genetică, fiind condiționate de anumiți *loci* de histocompatibilitate. Între diferitele preparate antigenice s-au observat și unele diferențe ale proprietăților fizico-chimice, ca rezistența la înghețare-dezghețare, comportamentul față de extracția lipidică, reacția la undele ultrasonice etc. (160).

Înainte de a descrie cîteva dintre principalele preparate antigenice obținute pînă acum și proprietățile lor, se vor prezenta cîteva informații generale asupra aspectelor care diferențiază antigenele de transplantare de alte sisteme antigenice cunoscute în biologie și anume: specificitatea, distribuția în organism și vîrsta la care apare în țesuturi.

a) **Specificitatea antigenelor de transplantare.** S-a constatat la șoareci că o singură alelă la nivelul *locus*-ului H dă naștere la antigene multiple (desemnate prin literele alfabetului). Bineînțeles că și celelalte alele determină, la rîndul lor, diferite antigene. Totuși, combinația dintre diferitele antigene s-a dovedit specifică pentru fiecare linie genetică de șoareci și este expresia diferenței alelice de la nivelul unui singur *locus* H. Ca urmare, injectarea unor celule de la un animal dintr-o linie genetică la altul din altă linie poate induce formarea unor aglutinine, care afectează și eritrocitele animalelor unei a treia linii genetice, demonstrînd că ultima linie genetică are unele componente antigenice comune cu prima linie. Pînă acum s-au separat antiseruri, relativ specifice pentru o anumită linie genetică, prin absorbția dintr-un anumit antiser a acelor aglutinine care realizează recunoașterea antigenelor specifice.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenele determinate de anumite alele se condiționează și se interferează cu alte antigene. De exemplu, alelele H-2^a condiționează și antigenele C, E, F și Y care se găsesc în alela H-2^c, ca și antigenele A, D, H, J, K, M și N din alte alele. Acest aspect se complică la infinit în momentul în care intervin mai multe alele determinante de antigene. În cazul sistemului antigenic determinat de *locus*-ul H-2 la șoareci, care a fost analizat în mod deosebit, fiind antigenul major, s-au ridicat o serie de probleme și anume: antigenele determinate de *locus*-ul H-2 sînt la fel de puternice în ceea ce privește răspunsul imun? Efectul antigenelor multiple este aditiv, adică o celulă cu patru antigene dă o reacție de două ori mai puternică decît o celulă cu două antigene? Existența eventuală a acestui efect aditiv poate fi evidențiată prin anumite teste, cum ar fi, de exemplu, viteza de eliminare a grefei? Antigenele multiple cu putere slabă (cum sînt cele determinate de *locus*-ul H-1), adiționate, pot genera un răspuns la fel de puternic ca acela generat de un antigen puternic izolat? Răspunsurile la aceste întrebări încă nu au fost date, iar studiul diversității antigenelor este în continuă dezvoltare.

b) **Distribuția antigenelor de transplantare în țesuturi.** Antigenele H-2 s-au găsit în majoritatea țesuturilor și organelor, însă în cantități variate. Astfel, creierul le conține în cantitate foarte mică (183). Antigenul de transplantare este specific fiecărui individ în parte și este identic în toate țesuturile și organele acestuia. Acest fapt a fost demonstrat experimental de Hubay și colab. (301), care au practicat la cîini cu homotransplant renal dirijarea sîngelui din vena renală în circulația portală. O grefă de piele provenind de la același donator care a dat și rinichiul, aplicată receptorului după 13—21 de zile, a suferit o eliminare accelerată. Inversînd grefele, adică aplicînd întîi grefa de piele și apoi pe aceea de rinichi, s-a obținut o eliminare accelerată a rinichiului, dovedind astfel identitatea antigenică dintre piele și rinichiul aceluiași donator. Rezultate similare au fost comunicate de Dempster (170), care a evidențiat dezintegrarea rapidă a homotransplantului de rinichi după aplicarea prealabilă a unei grefe de piele de la același donator.

MacKahn și Berrian (391) au arătat că antigenele sistemului H-3 se găsesc în cantitate mare în piele și epiteliul renal, dar nu se găsesc în celulele limfatice, deși acestea sînt capabile să inducă toleranța față de antigenul H-3 la nou-născuți. Antigenul specific de sex masculin se găsește în toate țesuturile, cu excepția țesutului testicular. Sîngele total viu nu provoacă imunitate de transplantare. Puterea sa antigenică rezidă numai în fracțiunea leucocitară, lipsind total din hematii, plasmă și trombocite.

Numărul antigenelor de histocompatibilitate de care depinde soarta unei grefe variază cu țesutul. În piele se pare că există 15 fracțiuni antigenice (35, 487), în splină aproximativ același număr (79), pe cînd în tumori numărul lor pare a fi mai mic (557, 594). De asemenea, în cazul ovarului, numărul lor este mai redus decît în cazul pielii (284). Potența acestor antigene este foarte variată (560).

Inducerea imunotoleranței specifice față de grefa de piele se poate obține prin pretratarea gazdei cu celule splenice, celule din ganglionii limfatici, celule timice și celule albe sanguine (62, 72), ceea ce înseamnă că toate antigenele care controlează acceptarea grefei de piele sînt prezente în aceste celule.

Scanned with OKEN Scanner

Urmărind repartiţia şi calitatea antigenelor de transplantare în diverse ţesuturi, Barnes (33) a obţinut o serie de rezultate interesante, pe care le redăm în continuare. Ca metodă de lucru, el a folosit grefarea şoarecilor cu diferite ţesuturi, a căror activitate antigenică urma a fi testată, şi aplicarea după 21 de zile a unei grefe secundare de piele de la acelaşi donator. Această ultimă grefă, prelevată după 7 zile, a fost examinată histologic pentru stabilirea procentului de celule epiteliale supravieţuitoare. Un procent mare de celule distruse a fost interpretat ca rezultînd dintr-o eliminare accelerată a grefei, ceea ce a arătat că grefa iniţială de ţesut a fost suficient de antigenică pentru a induce sensibilizarea animalului respectiv. Cu ajutorul acestei metode au fost testate peste 30 de ţesuturi, rezultatele obţinute fiind redate în tabelul 7.

Tabelul 7

Timpul de supravieţuire a grefei secundare A→CBA *

Grefa primară	Homografă		Izografă (control)	
	Numărul de experienţe	Celule epiteliale supravieţuitoare (%)	Numărul de experienţe	Celule epiteliale supravieţuitoare (%)
Piele	4	< 5	1	> 90
Piele (bilateral)	10	< 5	1	> 90
Piele (conservată)	4	> 90	1	> 90
Vezică urinară	4	< 5	1	> 90
Perete vaginal	5	< 5	1	> 90
Corn uterin	5	< 5	1	> 90
Vezicule seminale	5	< 5	1	> 90
Plămîn	5	< 5	1	> 90
Rinichi	4	< 5	1	> 90
Glande salivare	4	< 5	1	> 90
Ficat	5	< 5	1	> 90
Splină	5	< 5	1	> 90
Ganglioni limfatici	3	< 5	1	> 90
	1	> 90	—	—
Suprarenale	4	< 5	1	> 90
Testicul	5	< 5	1	> 90
Ovare	4	< 5	1	> 90
	1	> 90	—	—
Cerebrum	5	< 5	1	> 90
Cerebellum	5	< 5	1	> 90
Corpus callosum	4	< 5	1	> 90
Muşchi cardiac	4	< 5	1	> 90
Muşchi scheletic	5	< 5	1	> 90
Aortă	4	< 5	1	> 90
Os sternal	5	< 5	1	> 90
Cartilaj *(Xifi sternum)*	4	< 5	1	> 90
	2	> 90	—	—
Tendonul cozii	6	< 5	1	> 90
Stomac	5	< 5	—	—
Intestin subţire	5	< 5	—	—
Intestin gros	5	< 5	—	—
Grăsime inghinală	5	< 5	—	—
Timus	5	< 5	—	—

* După Barnes (33)

Scanned with OKEN Scanner

Aceste rezultate au demonstrat că toate ţesuturile testate au fost capabile să inducă un anumit grad de imunitate, suficient pentru a provoca o eliminare de tip accelerat a grefei secundare de piele. Singurele excepţii, eventuale, au fost constituite de ovar, ganglionul limfatic şi cartilaj. Aceleaşi experienţe au mai arătat că şi microgrefe de 0,05 g ţesut solid pot provoca o stare de imunitate. Pentru a induce imunitatea este necesar ca grefa de ţesut solid aplicată subcutanat sau intramuscular să conţină 1 000—3 000 de celule. Fără îndoială că dozele sînt mult inferioare acelora din suspensiile celulare şi de sute de ori mai mici decît doza utilizată de obicei pentru obţinerea unei unităţi de antigen purificat. Imunitatea obţinută cu suspensii celulare sau antigen purificat are o durată mai mică decît aceea obţinută prin grefe solide, care se menţine peste 6 luni.

Încercînd să evidenţieze, totuşi, diferenţe antigenice între ţesuturi, Barnes (33) a avut în vedere cele cinci tipuri histologice generale (epitelial, endocrin, limfoid, conjunctival şi parenchimatos). Rezultatele supravieţuirii epiteliului grefei secundare de piele după grefarea prealabilă a acestor diferite tipuri de ţesuturi sînt redate în tabelul 8.

Tabelul 8

Supravieţuirea celulelor epiteliale (%) ale grefei secundare de piele după grefarea prealabilă a cinci tipuri de ţesuturi *

Doza (g)	Ţesutul	90	90—10	10	Total
0,05	Parenchimatos	7	13	7	27
0,05	Endocrin	4	3	3	10
0,05	Limfoid	1	4	2	7
0,05	Conjunctival	5	12	3	20
0,05	Epitelial	12	4	5	21
0,10	Parenchimatos	1	1	5	7
0,10	Endocrin	3	0	1	4
0,10	Limfoid	3	5	9	17
0,10	Conjunctival	3	5	7	15
0,10	Epitelial	6	3	2	11
g	Total	45	50	44	139

* După Barnes (33)

Grupurile de ţesuturi au cuprins următoarele organe:
1. Parenchimatos: rinichi, ficat, cortex cerebral, cortex cerebelos, *corpus callosum*, plămîn.
2. Endocrin: testicul, ovar, tiroidă, suprarenală, glande salivare.
3. Limfoid: splină, ganglion limfatic, timus.
4. Conjunctival: grăsime, cartilaj, os, muşchii neted, cardiac şi scheletic, tendon, fascie, aortă, capsulă renală.
5. Epitelial: piele, uter, vagin, vezicule seminale.

După cum reiese din acest tabel, ţesutul epitelial este cel mai puţin antigenic din cele cinci grupe de ţesuturi (testate bineînţeles pentru o greutate egală). Prin dublarea dozelor (0,05→0,10 g) în toate cazurile, cu excepţia ţesutului epitelial, puterea imunizantă a primei grefe s-a dublat (procentul

Scanned with OKEN Scanner

celulelor epiteliale supraviețuitoare ale celei de a doua grefe de piele a scăzut la jumătate), dar explicația acestui fenomen n-a fost găsită încă.

În ceea ce privește localizarea lor celulară, la început s-a afirmat că antigenele s-ar afla îndeosebi în interiorul nucleului (469). Eritrocitele mamiferelor nu conțin antigene H-2, probabil datorită lipsei nucleilor. Recent, însă, prezența antigenelor a fost semnalată în fracțiunea microzomală și în membrana celulară (372).

c) **Eliberarea antigenelor din țesutul transplantat.** Eliberarea antigenelor din transplantare de grefe a fost studiată de mai mulți autori (139, 282, 417, 449). Converse și colab. (139) au arătat că grefele primare de piele plasate pe ureche la iepure sensibilizează gazda după 2 zile, fără a fi nevoie de prezența continuă a țesutului donatorului pentru a sensibiliza receptorul. Alți autori (282, 417), studiind la șoarece răspunsul secundar la grefe de piele, au găsit că timpul minimum necesar pentru sensibilizarea receptorului este de asemenea de 2 zile. Nathan (449) a stabilit că, în cazul transplantului vascularizat de rinichi la cîine, perioada de inducere a sensibilizării gazdei este de mai puțin de 24 de ore. Cantitatea de antigen eliberată de grefa de rinichi primară este proporțională cu durata perfuzării grefei cu sîngele gazdei. Procentul de animale care prezintă un răspuns de tip secundar (eliminare accelerată) la transplantul specific de rinichi este strict proporțional cu durata de timp a perfuzării primei grefe renale. Nathan (449) a introdus transplantele primare de rinichi în circulația gazdei pentru intervale de 3—24 de ore. După 7 zile, el a transferat cel de al doilea rinichi de la donator la aceeași gazdă. Cînd perfuzia inițială a fost mai scurtă de 2 ore și 30 de minute, numai la 10% dintre animale s-a evidențiat un grad ridicat de sensibilizare; cînd intervalul de perfuzie a fost de 3—6 ore, 40% din gazde au răspuns pozitiv; perfuzia primului rinichi timp de 9—24 de ore a determinat un răspuns pozitiv în 75% din cazuri. Așadar, cantitatea de antigen eliberată de un țesut transplantat crește în proporție directă cu durata timpului de perfuzie.

d) **Momentul apariției antigenelor de transplantare în raport cu vîrsta.** În această privință, toți autorii (123, 391, 428) sînt de acord că la șoareci antigenul H-2 este definitivat la naștere, deși eritrocitele nu sînt aglutinate sub acțiunea sa decît la 1—2 săptămîni de la naștere. Sensibilizarea față de antigen se poate obține însă începînd din ziua a 8-a de viață a șoricelului (600).

2. CELULA VIE CA ANTIGEN DE TRANSPLANTARE

Dacă unui animal i se injectează o cantitate anumită de celule vii, prenatal sau neonatal, deci cînd animalul este imatur imunologic, se obține toleranța acestuia față de o homografă de piele aplicată ulterior de la același donator, indiferent dacă celulele injectate inițial sînt de origine splenică, limfoidă sau timică (397). Hašek (275) a obținut același tip de toleranță cu ajutorul unei tehnici foarte ingenioase de parabioză embrionară. Injectarea de celule vii de diferite origini (splenică, limfoidă sau timică) unui animal adult și ca atare matur imunologic provoacă din partea acestuia o reacție identică cu reacția față de o homografă solidă (349), iar aplicarea unei homografe de

Scanned with OKEN Scanner

la același donator după cîteva zile de la injectarea acestor celule, este urmată de fenomenul de eliminare accelerată.

Reacția de imunitate de transplantare este specifică de individ și nu are nici o specificitate de țesut sau organ. Injectînd la iepuri adulți pe cale intravenoasă celule epidermice de la un iepure donator, Billingham și Sparrow (77) au observat un fapt neașteptat: homografa de la același donator, aplicată cîteva zile mai tîrziu, în loc să fie distrusă rapid (eliminare de tip secundar), a supraviețuit o perioadă îndelungată. Fenomenul a putut fi reprodus și la șoarece (349); el a apărut ca urmare a injectării unei cantități masive de celule epidermice. Cînd injectarea s-a făcut pe cale intravenoasă, dar cu o cantitate mică de celule epidermice, s-a obținut atît la iepure, cît și la șoarece o reacție imunitară caracteristică, adică eliminarea accelerată a homografei de piele. Din păcate, mortalitatea imediată sau tardivă a animalelor care au primit doze masive de celule epidermice a fost extrem de mare (349). Cauza acestei mortalități nu a putut fi stabilită; celulele epidermice nefiind competente imunologic, nu se poate incrimina intervenția unei reacții grefă-contra-gazdă pentru explicarea deceselor (5).

Aceste fapte au pledat pentru folosirea în experiențe a extractelor celulare și nu a celulelor ca atare, cu atît mai mult, cu cît folosirea ca antigene a celulelor limfoide, splenice sau timice, care sînt celule competente imunologic, provoacă de regulă reacții puternice grefă-contra-gazdă. În ultimii ani, direcția cercetărilor asupra antigenelor de transplantare s-a îndreptat tocmai spre obținerea unor preparate antigenice necelulare, purificate (8, 11, 13, 24, 52, 53, 61, 63, 76, 77, 89, 117, 279, 351, 352, 397).

3. FRACȚIUNILE SUBCELULARE ȘI EXTRACTELE CELULARE CA ANTIGEN DE TRANSPLANTARE

Primul studiu amănunțit asupra antigenelor de transplantare a fost făcut de Billingham și colab. (61, 91), care au stabilit caracterele și proprietățile antigenelor de transplantare în comparație cu antigenele clasice, bacteriene. Acești autori au caracterizat antigenele de transplantare în felul următor:

a) Antigenele de transplantare aparțin celulei vii, care este capabilă de a conferi imunitatea de transplantare. Tratarea unei suspensii vii de celule splenice sau limfatice prin încălzire 20 de minute la 48°5, uscare în stadiu de înghețare sau prin înghețări și dezghețări succesive (de 3—4 ori), duce la pierderea puterii antigenice a celulelor respective.

b) Puterea antigenică a celulelor vii se concentrează în nucleu, așa cum demonstrează folosirea acestora după distrugerea membranelor celulare prin ultrasunete și izolarea lor.

c) Celulele splenice dezintegrate prin ultrasunete își conservă puterea antigenică. Doza de celule necesară pentru a da o reacție imună violentă la șoarece este de 150—200 m (1 m=10^6 celule) și este constantă, indiferent de mediul folosit pentru suspendarea lor (mediu salin normal, tamponat la pH 7,4; mediu salin normal, citratat la pH 7,4; sucroză izotonică, soluție 0,29 M; apă distilată).

Scanned with OKEN Scanner

Prepararea nucleilor izolați din celule splenice, celule timice sau din leucocite s-a realizat prin distrugerea membranelor celulare cu ajutorul ultrasunetelor și prin centrifugări fracționate ulterioare la viteze mici în diferite medii de suspensie (soluție Ringer, conținînd ioni fosfat și ioni de calciu, cu pH 7,4; soluție de sucroză izotonică, avînd ioni de calciu, cu pH 7,4). Printr-un procedeu modificat (omogenizarea țesuturilor la un omogenizator cu turație mare, de tip Waring-Blendor, în locul distrugerii celulelor prin ultrasunete și al filtrării repetate prin vată de sticlă), aceiași autori (61, 91) au preparat suspensii de nuclei din rinichi. Randamentul metodei este însă mic: numărul nucleilor liberi obținuți este destul de scăzut. De exemplu, în cazul splinei sau al leucocitelor, se pot izola nucleii din aproximativ 40% din numărul inițial de celule, iar în cazul rinichiului se pot obține aproximativ 20—30 m nuclei (1 m = 10^6 nuclei) dintr-un rinichi de șoarece.

Particule citoplasmice s-au preparat numai din rinichi și ficat, folosindu-se ca mediu de suspensie soluția izotonică de sucroză sau mediul salin normal tamponat după recomandarea altor autori (263).

Verificarea antigenicității preparatelor de nuclei și a fracțiunilor citoplasmice a arătat că, în cea mai mare parte, materialul antigenic este cantonat în nuclei, antigenicitatea fracțiunilor citoplasmice fiind neînsemnată.

4. PROPRIETĂȚILE ANTIGENICE ALE NUCLEILOR IZOLAȚI ȘI ALE ANTIGENULUI NUCLEAR

Doza de 100 m nuclei s-a dovedit suficientă pentru a se obține o eliminare accelerată a grefei de piele aplicată la șoarece după injectarea prealabilă de nuclei. Scăderea dozei la 25 m nuclei a permis încă detectarea unei activități antigenice semnificative. În privința intensității reacției imunologice obținute prin administrarea nucleilor, s-a stabilit că doza de 100 m nuclei este echivalentă cu doza de 5 m celule intacte, deci că activitatea antigenică scade de 20 de ori, prin trecerea de la celula intactă la preparatul nuclear.

Nu există diferențe de eficiență a activității antigenice a preparatelor nucleare, generate de calea de administrare; atît calea intravenoasă cît și calea intraperitoneală s-au dovedit la fel de eficiente.

Stabilitatea puterii antigenice a nucleilor izolați este tot așa de limitată ca și aceea a celulelor vii izolate. Ambele preparate pot fi conservate la 3—5° în mediu salin tamponat numai o singură noapte. Încălzirea la 48°5, timp de 20 de minute, uscarea în stare înghețată, ca și înghețările și dezghețările succesive scad în mod apreciabil puterea antigenică a acestor preparate.

La șoareci, durata imunității conferită prin injectarea nucleilor izolați este de 15 zile; această imunitate dispare complet după 30 de zile de la administrarea lor.

5. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE ANTIGENULUI NUCLEAR

Tratarea suspensiilor nucleare timp de 60 de minute la 37° cu ribonuclează nu produce nici o modificare a puterii lor antigenice. Însă, acțiunea tripsinei asupra acestor suspensii este spectaculară: membrana nucleară se rupe

Scanned with OKEN Scanner

aproape instantaneu, preparatul devine mai întîi fibro-gelatinos, apoi se transformă într-o soluţie clară, moderat vîscoasă. Oprirea digestiei triptice după 10—60 de minute nu alterează proprietăţile antigenice ale preparatului. Tratarea antigenului nuclear cu dezoxiribonuclează la pH 6,8—7,2, timp de 60 de minute la 37°, modifică atît aspectul nucleilor, care devin translucizi şi contractaţi, cît şi puterea lor antigenică, pe care o reduce simţitor.

Pe baza acestor date s-a considerat că antigenul ar putea fi o dezoxiribonucleoproteină, dotată cu specificitate antigenică şi genetică. Încercările de a solubiliza preparatul în mediu salin fiziologic (NaCl 0,15 M) nu au reuşit, dar s-a izbutit solubilizarea sa cu apă, de unde a fost precipitat cu soluţie de $CaCl_2$ 0,0025 M. Extragerea antigenului cu NaCl 1 M micşorează mult puterea sa antigenică, iar soluţia de NaCl 2 M o aboleşte complet.

Preparatul antigenic nuclear solubil a putut fi folosit cu succes ca antigen în testul de hemaglutinoinhibare în serul şoarecilor imunizaţi fie cu celule vii, fie cu nuclei izolaţi din celulele unor animale din aceeaşi linie genetică.

6. NATURA CHIMICĂ A ANTIGENULUI NUCLEAR

Billingham şi colab. (61) au emis ipoteza că antigenul nuclear ar putea fi o dezoxiribonucleoproteină. Împotriva acestei ipoteze au fost aduse unele obiecţii şi anume: a) faptul că liofilizarea în mediu salin nu distruge complet puterea sa antigenică şi că b) grefele de piele devitalizată sînt în măsură să determine o uşoră sensibilizare faţă de grefa cutanată ulterioară (118).

Castermans şi Oth (118) au continuat investigaţiile asupra antigenului nuclear, urmărind să afle dacă dezoxiribonucleoproteinele fac sau nu parte din compoziţia lui. Într-o primă serie de încercări, aceşti autori au utilizat celule splenice şi timice, la care au separat dezoxiribonucleoproteinele de ceilalţi componenţi chimici celulari. Suspensia de celule în mediu salin normal, citratat, a fost omogenizată, centrifugată şi reomogenizată de cîteva ori. Depozitul, care în această condiţie conţine aproape totalitatea dezoxiribonucleoproteinelor, a fost dizolvat lent în apă distilată, pînă la obţinerea unui gel omogen, şi apoi s-a testat puterea lui antigenică. Determinările s-au făcut cu depozitul de dezoxiribonucleoproteine şi cu supernatantul respectiv luate ca atare sau după liofilizare şi tratare cu dezoxiribonuclează. Activitatea antigenică s-a repartizat între aceste două fracţiuni, fiind totuşi mai slabă în supernatant. Dezoxiribonucleaza nu a alterat puterea antigenică a preparatului, ceea ce înseamnă că activitatea antigenică cea mai importantă este independentă de dezoxiribonucleoproteine. Manipularea preparatelor nu a influenţat puterea lor antigenică. Supernatantul a prezentat o activitate antigenică de 4—5 ori mai mică decît numărul echivalent de nuclei intacţi şi, deci, de 100 de ori mai slabă decît numărul echivalent de celule vii. De asemenea, Castermans şi colab. (117) au încercat să purifice preparatul antigenic astfel obţinut, pornind direct de la nucleii izolaţi şi renunţînd la balastul citoplasmic neantigenic (61, 63). Ei au folosit supernatantul rămas după cîteva omogenizări şi centrifugări la viteze joase ale preparatului iniţial de celule. Acest supernatant a fost supus unor precipitări fracţionate prin coborîrea pH-ului, precipitatul cel mai antigenic fiind realizat la pH 5. Precipitatul anti-

Scanned with OKEN Scanner

genic s-a dovedit insolubil în soluţie fiziologică şi a fost contaminat cu hemoglobină şi ribonucleoproteine. De asemenea, din supernatantul iniţial s-a obţinut, prin precipitare cu soluţie saturată 50% de sulfat de amoniu un preparat antigenic mai slab, solubil în mediu salin citratat şi, deci, uşor de investigat electroforetic şi cromatografic. Precipitatul insolubil, obţinut la pH 5, supus în continuare acţiunii enzimatice a dezoxiribonucleazei, ribonucleazei, tripsinei, actinomicinelor F_1 şi B şi lizozimului, s-a dovedit foarte stabil; numai lizozimul i-a scăzut în mod evident puterea antigenică. Tratarea acestui preparat antigenic insolubil cu enzimele amintite a permis să se ajungă la un preparat antigenic nou, destul de purificat, fapt verificat prin examinarea sa cromatografică pe fosfat de calciu. Pentru elucidarea naturii chimice a acestui preparat antigenic purificat s-au folosit diferite metode uzuale de analiză a proteinelor şi acizilor nucleici (dozarea ADN, ARN, PNP, aminoacizilor şi proteinelor) (469), pornindu-se de la extractul nuclear iniţial, obţinut prin omogenizarea şi centrifugarea repetată a celulelor.

Pentru fracţionarea extractului nuclear se pot utiliza trei procedee: a) precipitarea acidă şi fracţionarea cu $(NH_4)_2SO_4$; b) precipitarea prin acidifiere în trepte; c) cromatografia pe fosfat de calciu.

a) **Precipitarea acidă şi fracţionarea cu $(NH_4)_2SO_4$.** La pH 5—4,5, în soluţie fiziologică, are loc precipitarea PNP, de care depinde, în cea mai mare măsură, activitatea antigenică. Fracţiunea solubilă (care rezultă după precipitarea PNP), supusă unei reprecipitări fracţionate cu $(NH_4)_2SO_4$, duce la realizarea unor preparate cu putere antigenică foarte redusă (tabelul 9). Precipitatul insolubil la pH 5 poate fi readus în soluţie prin creşterea pH la 10, dar în această condiţie preparatul este stabil numai cîteva ore.

Tabelul 9

Puterea antigenică a unor preparate obţinute prin precipitarea acidă şi fracţionarea cu $(NH_4)_2SO_4$ a extractului nuclear *

Tratamentul extractului	Extincţia la 280μ m	% din extincţia originară	Puterea antigenică (10 şoareci pe grup)
Extractul nuclear originar	500	100	18
Precipitare la pH 4,5	300	60	18
Precipitatul obţinut la pH 4,5, tratat cu: soluţie $(NH_4)_2SO_4$, saturată 0,40%	40	8	2
soluţie $(NH_4)_2SO_4$, saturată 40—60%	20	4	3
soluţie $(NH_4)_2SO_4$, saturată 60—80%	40	8	Toxic
soluţie $(NH_4)_2SO_4$, saturată 80—100%	80	16	1

* După Castermans şi Oth (117)

b) **Precipitarea prin acidifiere în trepte.** Acest procedeu constă în fracţionarea materialului activ prin scăderea în trepte a pH-ului de la 7 la 5,5 ($7 \rightarrow 6$; $6 \rightarrow 5{,}5$; $5{,}5 \rightarrow 5$; $5 \rightarrow 4{,}5$). Cea mai mare parte a materialului antigenic precipită între pH 7 şi pH 5,5. Omogenizarea precipitatului cu soluţie citratată la pH 7 readuce în soluţie 20—30% din precipitat, fără

Scanned with OKEN Scanner

a afecta însă puterea antigenică a precipitatului nesolubilizat. Soluţia obţinută astfel nu este antigenică.

c) **Cromatografia pe fosfat de calciu.** Deoarece precipitatul obţinut la pH 5 nu este solubil la pH neutru, s-a încercat pentru purificarea acestui preparat antigenic metoda cromatografiei pe fosfat de calciu, descrisă de Tiselius şi colab. (593), pornindu-se de la extractul originar şi trecînd prin fazele descrise mai înainte [precipitare cu soluţie saturată 50% de $(NH_4)_2SO_4$ şi solubilizarea ulterioară în apă sau tampon-fosfat 0,01 M la pH 7]. Cromatografia pe fosfat de calciu a permis izolarea din extractul nuclear a patru fracţiuni (A, B, C şi D). Fracţiunea D s-a dovedit în mod constant inactivă. S-au dovedit a fi active fracţiunile B şi C, însă, în general, se observă o pierdere foarte marcată a activităţii antigenice globale datorită operaţiilor metodei.

Analiza chimică a fracţiunii antigenice obţinută prin precipitare la pH 5 a arătat că ea are o greutate moleculară de 15 000 şi este constituită din PNP şi două fracţiuni proteice. Extragerea antigenului din celule epidermice, cu ajutorul acestei metode, a permis să se obţină un preparat antigenic tisular eficace şi netoxic pentru animalele injectate (351).

Unul dintre primele fapte stabilite cu privire la natura chimică a antigenelor de transplantare a fost infirmarea participării obligatorii a ADN (61, 279, 469) şi a ARN (116) la molecula antigenică.

În tabelul 10 sînt redate cîteva date asupra structurii chimice a cîtorva extracte antigenice, obţinute cu ajutorul metodelor prezentate mai sus (63, 117, 351).

Tabelul 10

Compoziţia chimică a unor extracte antigenice tisulare obţinute prin diferite procedee *

Extractul antigenic **	Doza (mg proteine)	Proteine (%)	ADN (%)	ARN (%)	Galactoză + manoză (%)
I	1,50	83,3	1,1	13,9	1,7
II	0,50	92,6	3,0	2,48	4,9
III	0,50	96,0	—	—	4,0
IV	0,22	93,5	2,5	1,5	3,0
V	1,10	67,1	29,3	1,5	3,0
VI	0,15	85,1	—	11,8	3,1

* După Castermans şi Oth (117)

** În mod obişnuit, preparatul antigenic a fost echivalent cu 500×10^6 celule, cu excepţia preparatului V care a fost echivalent cu 5×10^6 celule.

Procedeele de obţinere a extractelor antigenice:
I — extract după metoda lui Castermans şi Oth (117); II — sedimentul rezultat după centrifugarea la 25 000 g, timp de 30 de minute a preparatului I, tratat cu tripsină; III — sedimentul rezultat după centrifugarea la 25 000 g, timp de 30 de minute a preparatului II, tratat cu ribonuclează; IV — extract după metoda lui Lejeune-Ledant şi Albert (351); V — extract după metola lui Billingham, Brent şi Medawar (63); VI — extract obţinut prin metoda electroforetică.

Cercetările lui Vranken-Paris şi colab. (613) au adus o serie de date interesante asupra constituţiei chimice a antigenului nuclear. Aceşti autori au concentrat extractul de celule timice şi splenice al lui Castermans şi Oth (117) la pH 5 şi au obţinut un preparat care a reprezentat numai 1,75% din materialul iniţial. Acest preparat a fost supus în continuare digestiei cu tripsină şi

Scanned with OKEN Scanner

acțiunii ribonucleazei, obținîndu-se astfel un preparat final, care a avut o greutate uscată de 0,28% din greutatea umedă a materialului inițial. Analiza acestui ultim preparat din celule splenice a evidențiat următoarea compoziție:

Azot	9,9%
Lipide	40%
Hexoze	26%
Hexozamine	0,8%
ANAN	0,54%

(ANAN este prescurtarea pentru acidul N-acetilneuraminic, prin care se exprimă conținutul în acizi sialici totali).

Conținutul de aminoacizi al unor asemenea preparate, obținute fie din celule splenice, fie din celule timice, este foarte apropiat ca proporții relative (tabelul 11), pe cînd conținutul de azot total și azot aminat în preparatul provenind din celule splenice este mai ridicat decît același conținut în preparatul provenind din celule timice.

Puterea sensibilizantă și hemaglutinoinhibitoare a preparatelor antigenice ale lui Vranken-Paris și colab. (613) a fost verificată. Încercarea de solubi-

Tabelul 11

Conținutul de aminoacizi al unui preparat antigenic purificat, obținut din celule splenice și timice (g/100 g preparat) *

Aminoacidul	Preparatul din celule splenice	Preparatul din celule timice
Acid aspartic	5,3	2,5
Treonină	2,7	1,3
Serină	3,0	1,6
Acid glutamic	6,0	3,1
Prolină	2,1	1,1
Glicină	2,2	1,4
Alanină	2,8	1,6
Valină	3,8	2,3
Izoleucină	2,7	1,7
Leucină	5,1	2,8
Tirozină	2,2	1,0
Fenilalanină	3,0	1,3
Lizină	4,0	1,9
Histidină	1,4	0,7
Arginină	3,5	1,8
Amoniac	1,1	1,5

* După Vranken-Paris și colab. (613)

Scanned with OKEN Scanner

lizare a celui mai purificat preparat al acestor autori prin hidroliză acidă s-a soldat cu obţinerea unui preparat cu o putere antigenică foarte mult diminuată. Hidroliza alcalină produce un preparat cu acţiune nespecifică, care nu poate fi deci folosit. Preparatul obţinut prin hidroliză acidă are un conţinut relativ crescut de acizi sialici, însă tratarea lui cu sialidază nu-i modifică puterea inhibitoare, ceea ce arată că acizii sialici nu intervin în funcţia antigenului de transplantare. Fracţiunea dializabilă a acestui preparat este formată dintr-o serie de polipeptide mici şi ANAN liber, iar capacitatea lui de sensibilizare şi inhibiţie este netă. Fracţiunea nedializabilă a aceluiaşi preparat posedă de asemenea activitate antigenică. Analiza acestei fracţiuni a arătat că migrează electroforetic în mod uniform, că prezintă absorbţia maximă în ultraviolet la 275 mμ şi că din punct de vedere chimic are următoarea compoziţie:

Azot total	13,4%	Hexoze	1,0%
Lipide	11,0%	Fosfor	1,0%.

Cromatografia pe hîrtie a arătat că hexozele sînt formate din galactoză, glucoză sau manoză şi produse aminate hidrolizabile cu R_F ridicat, de tipul celor care se întîlnesc în unele fosfolipide.

Fracţiunea nedializabilă a acestui preparat, comportîndu-se ca o substanţă omogenă în cîmpul electroforetic, se poate presupune că este constituită dintr-o fracţiune unică.

Greutatea ei moleculară, apreciată prin metoda ultracentrifugării, ar fi de 28 000. Molecula sa pare a fi de asemenea foarte hidratată şi/sau foarte asimetrică, avînd, probabil, un număr mare de grupări liofile şi conţinînd fosfor în cantitate apreciabilă. Încercările de extragere a lipidelor din această fracţiune cu solvenţi organici nu au dat rezultate pozitive (613).

Autorii acestor preparate înclină să identifice antigenul de transplantare cu o fosfolipoproteină, avînd greutatea moleculară de 28 000, cu toate că puterea sensibilizantă şi inhibitoare a acestei fracţiuni este mult diminuată faţă de extrasele originale, fapt atribuit denaturărilor care pot interveni în mersul prelucrărilor (tabelul 12).

Tabelul 12

Puterea sensibilizantă şi inhibitoare a unor extracte tisulare *

Extractul tisular	Combinaţiile de şoareci folosiţi în testare	Puterea sensibilizantă		Puterea inhibitoare	
		Doza pentru un şoarece (mg)	Numărul de eliminări de tip secundar la 10 animale	Doza pentru un tub (mg) la un volum de 0,25 ml	Numărul de unităţi
Preparat iniţial	C57BL→ASW	10,0	10,0	1,5	2^5
Preparat purificat	C57BL→ASW	1,0	9,0	1,5	2^5
Preparatul purificat hidrolizat la pH 2, timp de 4 ore	C57BL→ASW	—	—	1,0	2^5
Fracţiunea dializabilă din supernatant	A→CBA	0,5	2,5	—	—
Fracţiunea nedializabilă din supernatant	C57BL→ASW	—	—	1,0	2^5
Reziduu	C57BL→ASW	—	—	2,0	2^5

* După Vranken-Paris şi colab. (613)

Scanned with OKEN Scanner

7. PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ALE ANTIGENULUI NUCLEAR

Proprietățile biologice ale diferitelor preparate antigenice nucleare s-au urmărit prin provocarea eliminării accelerate a grefei de piele sau prin dozarea hemaglutininelor serice și prin testul hemaglutinoinhibiției. Determinările s-au făcut pe iepuri și șoareci, obținîndu-se date deosebit de interesante.

La iepuri, injectarea de extracte antigenice din celule epidermice (349) produce o reacție accelerată de dezintegrare a homografelor de piele, care provin de la același donator sau chiar de la unii donatori neînrudiți genetic cu receptorul, în ultimul caz reacția fiind însă mai slabă în intensitate. Reacția se obține constant cu o doză de extract echivalentă cu 5×10^6 celule epidermice. Uneori, pe lîngă dezintegrarea accelerată a grefei specifice (același donator de piele și celule) și a celei nespecifice (alt donator de piele decît donatorul de celule), s-a constatat că poate suferi distrugeri importante însăși autografa de control. Fenomenul se confirmă folosind și un alt extract antigenic (extractul splenic al lui Billingham, Brent și Medawar) (63), ceea ce înseamnă că este vorba, într-adevăr, de o pierdere a specificității de individ a antigenului. Injectarea pentru control a celulelor vii (splenice sau epidermice) nu are consecințe similare, ceea ce demonstrează că fenomenul menționat este propriu extractelor celulare (116). La șoareci, injectarea unui extract celular epidermic, echivalent cu o doză de celule de 5×10^6, administrată intraperitoneal, sensibilizează în 3 zile receptorul față de o homografă de piele de la același donator și provoacă eliminarea ei accelerată.

Injectarea unui extract de celule epidermice sau splenice, prelevate de la cîine, la o altă specie animală (de exemplu la șoarece) provoacă o reacție de imunitate de transplantare semnificativă, deși dezintegrarea grefei ulterioare de piele este mai puțin brutală decît în cazul receptorului din aceeași specie.

Fenomenul imunității de transplantare nu apare însă în combinațiile cîine-iepure.

În concluzie, între proprietățile antigenice ale celulelor vii și extractele lor există diferențe importante; reacția imunitară provocată la receptor de extractele antigenice tisulare se deosebește de reacția imunitară declanșată de celulele vii, cu toată aparența de analogie a acestor două reacții.

Injectarea unor celule vii de la un donator adult la un receptor adult, între ei existînd disparitate genetică, produce totdeauna o reacție de imunitate de transplantare cu specificitate de individ. Această specificitate de individ se întîlnește de asemenea în mod constant în cazul inducerii toleranței prin injecții de celule vii la animale nou-născute. Cînd celulele vii sînt înlocuite cu extractele lor antigenice, specificitatea de individ a reacției imunitare poate să dispară, indiferent de tipul celulelor folosite pentru prepararea extractelor (splenocite, celule epidermice) sau de procedeul de extragere (63, 349). În unele cazuri, în care se folosesc extracte antigenice tisulare, nici specificitatea de specie nu este în întregime respectată.

Pentru explicarea acestui fenomen nu se pot oferi decît ipoteze: fie existența multiplicității antigenelor de transplantare la unul și același individ și necesitatea ca toate să fie prezente pentru menținerea specificității individuale, posibil fiind însă ca în cursul manifestărilor imunitare unele antigene să se piardă, fie dependența strictă a antigenelor de transplantare ale diferiților

Scanned with OKEN Scanner

indivizi de anumite structuri moleculare foarte apropiate, specificitatea de individ sau chiar de specie fiind condiţionată de o fracţiune particulară a acestor structuri moleculare, a cărei antrenare sau distrugere poate să determine pierderea acestei specificităţi.

Cu extracte antigenice tisulare nu s-a reuşit pînă în prezent inducerea unei toleranţe imunologice adevărate, deoarece nu s-a putut asigura persistenţa îndelungată a antigenului în organismul receptorului, condiţie indispensabilă în inducerea toleranţei imunologice. Fără îndoială că un alt motiv important al diferenţelor dintre proprietăţile biologice ale antigenelor celulelor şi acelea ale extractelor antigenice tisulare este modul de preparare a acestora din urmă.

Studiind modificările extractelor antigenice, ca urmare a metodelor de preparare folosite, Mann şi colab. (368) au ajuns la următoarele concluzii:

a) Puterea antigenică a unor preparate tisulare depinde de condiţiile în care s-a făcut omogenizarea ţesutului. Folosirea omogenizatoarelor mecanice cu viteze mari, în locul omogenizatoarelor manuale, duce la o diminuare importantă a puterii antigenice a preparatului.

b) Folosirea soluţiilor saline de diferite molarităţi (0,15 M, 0,075 M, 0,03 M) sau a apei influenţează valoarea antigenică a preparatului. Puterea antigenică maximă a preparatelor tisulare s-a obţinut numai cînd s-au folosit soluţiile 0,15 M şi 0,075 M.

c) Deşi Billingham şi colab. (63) susţin că îngheţarea-dezgheţarea repetată scade puterea antigenică a preparatelor tisulare, se poate asigura o activitate antigenică apreciabilă unor asemenea preparate prin îngheţare rapidă în amestec de gheaţă uscată şi acetonă, urmată de topire rapidă, în baie, la 37°.

8. EXTRACTUL ACELULAR CA ANTIGEN DE TRANSPLANTARE ŞI PROPRIETĂŢILE SALE BIOLOGICE

Obţinerea unui antigen de histocompatibilitate, lipsit de fragmente celulare, ar oferi pentru studiile biologice privind transplantarea ţesuturilor şi organelor cîteva avantaje (posibilitatea administrării lui în cantităţi fixe, posibilitatea reducerii imunotoleranţei fără riscul apariţiei reacţiei grefă-contragazdă etc.). De aceea, numeroşi autori (91, 160, 316, 317, 375, 399) au încercat să obţină un astfel de preparat, folosind pentru testarea eventualei sale activităţi fie capacitatea de a provoca eliminarea accelerată a grefei ulterioare de piele (91, 399), fie capacitatea de a inhiba hemaglutininele serurilor specifice la şoarece (160, 350), fie, în sfîrşit, capacitatea de a declanşa fenomenul de facilitare a grefării ţesuturilor tumorale (316, 317).

Aşa cum s-a subliniat în secţiunea precedentă a acestui capitol, în care s-au descris principalele metode folosite pentru prepararea extractelor antigenice, majoritatea lucrărilor în acest domeniu, cu cîteva excepţii (91, 350, 399), au fost consacrate în special analizei chimice şi purificării acestor antigene, activitatea lor biologică suscitînd în mai mică măsură interesul cercetătorilor. În 1965, Monaco şi colab. (430), utilizînd o metodă simplă şi lucrînd cu şoareci, au obţinut un nou preparat antigenic, un extract acelular, pornind de la ţesut de splină omogenizat în sucroză tamponată. Deşi din punct de vedere chimic preparatul nu este pur, iar diferenţele de histocompatibilitate se datoresc mai multor fracţiuni antigenice, acest preparat global a fost soco-

Scanned with OKEN Scanner

tit ca un singur antigen şi a fost urmărit ca atare din punct de vedere biologic. Extractul antigenic acelular al lui Monaco şi colab. (430) s-a dovedit foarte activ şi remarcabil de stabil şi a fost folosit cu succes în numeroase experienţe interesante, ale căror rezultate sînt prezentate succint în continuare. Testarea preparatului s-a făcut pe şoareci din linii genetice diferite şi anume: C57BL/6(H-2^b), A/Jax(H-2^a) şi C3H/He(H-2^k). Grefele de piele s-au practicat după tehnica obişnuită (55), supravieţuirea lor medie fiind de 9,8 zile $\pm$ 0,2 zile. Antigenul a fost administrat pe cale intravenoasă, iar activitatea lui s-a raportat la echivalentul splenic, splina de şoarece avînd în medie 80 mg şi echivalentul splenic fiind cantitatea de antigen existentă în 80 mg ţesut splenic. Splinele au fost recoltate în soluţie de sucroză 0,25 M la pH 7,5 care conţinea K^+ şi Mg^{++} ca stabilizatori ai membranelor microzomale (mediul A). Ţesutul a fost omogenizat la pH 6,7—6,9, congelat şi liofilizat. Înainte de administrare, preparatul a fost resuspendat în apă distilată. În primul rînd s-a cercetat distribuţia ultracentrifugală a fracţiunilor antigenice ale omogenatului. Prin centrifugări repetate la diferite turaţii s-au obţinut două fracţiuni: una nucleară şi una citoplasmică. Fracţiunea nucleară, dobîndită cu ajutorul acestei metode, nu a avut proprietăţi antigenice, întreaga putere antigenică fiind depistată în fracţiunea citoplasmică. Această fracţiune a fost centrifugată în continuare la turaţii variate, progresive (de la 5 000 g la 105 000 g), obţinîndu-se astfel opt preparate. Abia după centrifugare la 105 000 g a fost recuperat tot antigenul în sediment, spre deosebire de celelalte fracţiuni în care el a rămas împărţit între sediment şi supernatant. Dintre aceste fracţiuni s-au studiat sedimentul obţinut după centrifugare la 5 000 g şi sedimentul obţinut după centrifugare la 105 000 g. Ambele preparate s-au dovedit remarcabil de stabile la îngheţare, liofilizare, păstrare îndelungată la —20° şi expunere prelungită la medii cu reacţie alcalină (pH 9,5). Ele au prezentat o puternică acţiune sensibilizantă (doza activă variind între 8 şi 80 mg ţesut splenic), egală cu aceea a cantităţii de celule vii din care s-a extras. Efectul lor rapid şi de durată scurtă nu este influenţat de calea de administrare, fiind identic dacă se administrează intravenos sau intraperitoneal. Injectarea lor în cantitate mare, folosind una din aceste căi, prelungeşte supravieţuirea homografei de piele, ceea ce înseamnă că induc un oarecare grad de imunotoleranţă (în special dacă se practică administrarea intravenoasă repetată).

9. CORELAŢIA DINTRE ANTIGENELE DE TRANSPLANTARE ŞI ANTIGENELE HEMAGLUTINANTE

O dată ce s-a demonstrat faptul că sistemul H-2 la şoarece controlează producerea antigenelor cu putere sensibilizantă şi a antigenelor cu capacitatea de a provoca apariţia hemaglutininelor serice s-a pus problema dacă aceste antigene sînt distincte sau, dimpotrivă, este vorba de un singur antigen cu mai multe funcţii şi dacă aceste funcţii sînt exercitate simultan numai în celula vie sau se regăsesc asociate şi în extractele celulare. În cazul celulelor vii, corelaţia s-a dovedit a fi foarte strînsă (92). O grefă are două efecte distincte asupra receptorului: pe de o parte, ea îl sensibilizează în sensul că o a doua grefă de la acelaşi donator este eliminată în mod accelerat, iar pe de altă parte, ea îl imunizează în sensul că acesta formează anticorpi umorali hem-

Scanned with OKEN Scanner

aglutinanți. În consecință, se poate presupune fie că între aceste antigene există identitate, fie că, așa cum susține Snell (558), este vorba de două antigene cu determinantă de grup similar, care diferă între ele numai în funcție de răspunsul imun.

Hildemann și Medawar (287) nu au reușit însă să arate că antigenul cu putere sensibilizantă poate să absoarbă sau să inhibe anticorpii umorali. Ulterior, însă, cu alte preparate (63, 91, 167, 283, 350, 316) s-a obținut absorbția și inhibiția anticorpilor umorali *in vitro* și s-a indus formarea lor *in vivo*.

S-a observat că acțiunea imunologică a antigenelor depinde de proprietățile lor fizico-chimice și de forma și calea de administrare (316, 350) (de exemplu, extractele solubile sau semisolubile injectate intravenos nu au putere sensibilizantă, iar antigenele tratate cu solvenți lipidici își mențin proprietățile sensibilizante, dar le pierd pe cele hemaglutinante).

Așadar, unele extracte antigenice au atît acțiune sensibilizantă, cît și de producere a hemaglutininelor *in vivo* (cu condiția ca să fie injectate repetat și în doze mari), iar *in vitro* au acțiune hemaglutinoinhibantă. Această multivalentă funcție s-a înregistrat însă la preparate destul de puțin purificate; pînă în prezent nu s-a izolat o substanță antigenică pură și omogenă, care să posede proprietățile biologice menționate.

Fracționarea celulară a permis să se arate că în fracțiunea microsomală se localizează antigenul de facilitare a creșterii tumorale (315) și acela de eliminare a grefei de piele și inhibiției hemaglutinării (176, 370, 375). Este însă greu să se obțină rezultate exacte, deoarece din celulele sferice sau tumorale, care au nucleul foarte mare nu se pot separa fracțiuni subcelulare pure prin centrifugare, pe baza gradientului de densitate; prin testarea tuturor fracțiunilor celulare separate cu ajutorul acestei metode, o parte a activității antigenice se regăsește în fracțiunea nucleară. De asemenea este greu de izolat nucleul de materialul membranei.

În cazul celulelor tumorale CL2/Balb/c, injectate la șoareci C3H, titrurile hemaglutinante determinate cu hematii Ajax prezintă următoarele valori (166):

Celule splenice	3 840
Nuclei CL2	800
Mitocondrii CL2	1 280
Supernatant CL2	2 000
Microsomi CL2	1 280
Suc celular CL2	60.

În cazul celulelor netumorale, repartiția titrurilor hemaglutinante este similară (166). De exemplu, fracțiunile de celule splenice ale hibridului $(C57BL \times C3H)F_1$, injectate la șoareci Balb/c au provocat următoarele titruri hemaglutinante, testate cu hematii Ajax:

Celule splenice	340
Nuclei	100
Mitocondrii	117
Microsomi	330
Suc celular	10.

Scanned with OKEN Scanner

Cu doze imunizante mai mici de fracțiuni subcelulare, răspunsul prin creșterea titrului hemaglutininelor poate fi limitat la fracțiunea microzomală și supernatant.

Extractele antigenice din lichidul de ascită leucemică au permis să se demonstreze că specificitatea X de leziune leucemică la șoarecii EL4(C57BL) și CL2(Balb/c) urmează specificitatea H-2 (164). Cu fracțiunile subcelulare ale celulelor leucemice, s-a arătat că cea mai mare activitate hemaglutinantă este deținută tot de microzomi și de supernatant.

În privința specificității legată de sex (Y), testarea, făcută după Howard (294), prin evaluarea splenomegaliei din reacția grefă-contra-gazdă, a arătat că microzomii izolați din celulele splenice de la șoareci masculi F_1 sînt mai eficace decît alte fracțiuni. În 4 cazuri, în care s-au separat microzomii de stratul supernatant, acesta s-a dovedit mai activ decît microzomii. Fracțiunea nucleară dă rezultate variabile, în funcție, probabil, de dezintegrarea celulară. În continuare sînt redate, după Davies (166), procentele de inhibare a splenomegaliei reacției grefă-contra-gazdă prin diferite fracțiuni subcelulare, în comparație cu același efect al celulelor splenice, luate ca etalon (100%):

Celule splenice de șoarece mascul F_1	100%.
Aceleași celule macerate	95%
Microsomii	68%
Mitocondrii	40%
Suc celular	10%.

Femelele din linia de șoareci C57BL, dar nu și masculii, au în ser hemaglutinine împotriva grupului eritrocitar uman A (nu au împotriva grupului B sau 0) (286). S-a demonstrat că acesta este un efect Y și că grupul eritrocitar uman A este purtător de antigene Forssman. Femelele C57BL posedă și hemaglutinine antioaie în serul lor (582).

În caracterizarea diferitelor preparate antigenice este necesar să se țină seamă că nu totdeauna există paralelism între diferitele teste folosite. Compararea titrurilor hemaglutinoinhibante nu poate fi făcută decît pentru substanțe testate în același laborator, deoarece în acest scop se folosesc diluții de ser alese arbitrar, iar acest fapt afectează titrurile în mod deosebit (18). Este greu de apreciat de asemenea dacă diferențele de histocompatibilitate sînt puternice sau nu. Metodele de hemaglutinare depind, printre altele, de prezența sau absența antigenelor respective în hematie, testele citotoxice depind de factori similari ai celulelor folosite, iar grefa de piele oferă posibilitatea unei eliminări gradate, dar pînă la un punct aceasta este dependentă de timpul necesar producerii. În mod surprinzător s-a observat că intensitatea reacțiilor grefă-contra-gazdă este în concordanță cu intensitatea hemaglutinării.

Se pare că pentru studiile asupra antigenelor, funcția microzomală trebuie aleasă preferențial, în condițiile procedeelor standard de fracționare.

Pe mai multe linii genetice de șoareci s-a stabilit că specificitățile de *locus* H-2 și de alți *loci* decît H-2, ca și specificitatea X (de leziune leucemică) au reprezentare pe suprafața celulară. Pînă cînd membranele celulare nu vor putea fi perfect separate de conținutul celulei, este greu de susținut în ce măsură aceste specificități antigenice există și în interesul ei. O evidență încă insuficientă sugerează că lizozomii ar putea constitui o sursă de activitate

Scanned with OKEN Scanner

antigenică (39). De asemenea, trebuie să se țină seama de activitatea antigenică a stratului supernatant, care conține mitocondrii ușoare, microsomi grei și, probabil, lizozomi.

Pentru perspectivele inducerii toleranței este important să se realizeze separarea specificităților nelegate de *locus*-ul H-2 la șoarece și a antigenelor slabe similare ale altor specii. Prezența antigenelor nelegate de *locus*-ul H-2 în preparatele antigenice H-2 a fost semnalată în cîteva studii: prin metoda reacției grefă-contra-gazdă (165), prin toleranța la grefă (399) și printr-un test citotoxic (18).

Analizele chimice ale antigenelor au confirmat numai că acestea derivă din membrane (510), fără a da însă posibilitatea de a se preciza legătura lor cu membrana reticulului endoplasmic.

Ca o confirmare a datelor lui Davies (166), Al-Askari și colab. (4), urmărind distribuția antigenelor în fracțiunile subcelulare, au ajuns la următoarele concluzii: a) microzomii din splină funcționează ca antigene de transplantare puternice, dacă sînt injectați pe cale intradermică sau intraperitoneală; b) administrarea lor pe cale intravenoasă le diminuează capacitatea de a induce sensibilitate maximă față de o homografă; c) tratarea microzomilor splenici cu dezoxicolat sau prin liofilizare duce la pierderea capacității lor antigenice; d) microzomii hepatici au activitate antigenică inferioară celor splenici.

10. COMPONENȚA LIPIDICĂ A ANTIGENULUI DE TRANSPLANTARE

Deși se admite astăzi că specificitatea antigenelor de transplantare (T), de facilitare tumorală și histocompatibilitate (H) este aceeași, există încă multe aspecte nelămurite în privința lor, la a căror rezolvare ar avea o contribuție hotărîtoare obținerea unor antigene purificate. Se știe că antigenele T, E și H sînt legate de formațiuni structurale ale celulei (61, 63, 283, 313, 315), că ADN și ARN nu fac parte din compoziția lor (116, 279) și că ele conțin proteine, lipide și probabil carbohidrați. Davies (160), printr-un procedeu relativ simplu de fracționare, a reușit să obțină din celule de ascită tumorală de la șoareci o lipoproteină a cărei activitate antigenică este de 500 de ori mai mare decît a celulelor din care a fost izolată. Activitatea antigenică a acestei lipoproteine a fost determinată prin testul de hemaglutinare și hemaglutioinhibiție. Autorul nu a reușit să demonstreze omogenitatea produsului, dar nici să evidențieze prezența unor impurități. Proporția de lipide este de 30—50%, iar proporția de proteine de 70—50%. Componenta proteică este specifică pentru linia genetică de șoareci folosită și provine din structura membranei celulare. La componenta lipidică este asociată specificitatea de *locus* H-2.

Deci componenta proteică pare a fi un antigen de sine stătător și pare disociată de antigenul H-2; componenta lipidică apare ca un complex de lipide diferite (283). O lipoproteină antigenică au izolat de asemenea Kandutsch și Stimpfling (316), prin solubilizare în triton (X-100) a unei fracțiuni de structuri celulare din sarcomul I la șoarece. S-a folosit forma ascitică a acestui sarcom, fracțiunea de particule constînd, în special, din membrane

Scanned with OKEN Scanner

celulare. Extracţia lipoproteinei s-a realizat cu soluţie 5% de triton X-100 la pH 9, prin centrifugare o oră la 105 000 g, precipitare cu acetonă şi spălare cu eter. Din materialul iniţial extras cu triton, lipoproteina reprezintă aproximativ 20—40%. Produsul apare omogen la examenul electroforetic şi s-a dovedit izoantigenic prin testul de potenţare tumorală şi prin cel de inhibiţie a hemaglutinării (315, 317). Lipoproteinele au fost identificate ca o componentă importantă a membranelor celulare (263, 283). Lipoproteina antigenică este total insolubilă în apă la pH neutru, dar se solubilizează la acest pH în prezenţa tritonului X-100. Incubarea sa cu venin de *Crotalus adamanteus* nu modifică în mod semnificativ conţinutul său total în lipide şi aminoacizi, dar duce la apariţia unui produs solubil în apă chiar în absenţa detergentului; în testul de hemaglutinoinhibare, acest produs solubil s-a dovedit mai activ decît lipoproteina insolubilă; în cîmpul electroforetic se comportă ca o substanţă foarte omogenă. Factorul activ din veninul de şarpe este fosfolipaza (314); ea acţionează preferenţial asupra fosfatidiletanolaminei prezentă în lipoproteina antigenică. Creşterea solubilităţii lipoproteinei poate fi atribuită acţiunii enzimei de conversiune a fosfatidelor legate iniţial în lizofosfatide. Greutatea moleculară aproximativă a lipoproteinei antigenice este sub 200 000.

Prin procedeul lui Kandutsch şi Stimpfling (317), Ogburn şi colab. (464) au obţinut din fragmente celulare din ganglioni limfatici şi din splină, la iepure, preparate solubile în apă ale antigenului implicat în eliminarea grefei. Fragmentele celulare din ganglionii limfatici şi splină, izolate prin centrifugare sau din lichidul de spălare repetată a celulelor, au fost tratate cu triton X-100, iar reziduul insolubil care a rezultat din această operaţie a fost solubilizat cu venin de şarpe. S-au obţinut două fracţiuni în cantităţi relativ egale: o fracţiune salinosolubilă a extractului în triton şi o fracţiune solubilizabilă cu venin de şarpe. Activitatea lor antigenică a fost testată cu ajutorul serurilor de iepure antileucocitare omologe faţă de anticorpii supresivi purificaţi din aceste seruri. Preparatele antigenice au dat rezultate pozitive în următoarele teste: aglutinarea hematiilor cu anticorpi supresori, absorbiţi pe suprafaţa lor, absorbţia pe hematii cu aglutinarea lor ulterioară de către serul antileucocitar şi inhibiţia procesului de absorbţie-hemaglutinare prin soluţii de antigen.

S-a cercetat de asemenea dacă aceste antigene se asociază la eliminarea celulelor limfatice ganglionare transferate de la un iepure donator la un altul receptor. S-a constatat că ambele preparate absorb din serul de iepure antileucocitar anticorpii responsabili de suprimarea celulelor limfatice ganglionare transferate. Deşi, în linii generale, metodele folosite de Kandutsch şi Stimpfling (317) şi Ogburn şi colab. (464) sînt asemănătoare, există cîteva aspecte care le diferenţiază şi care merită a fi subliniate. În primul rînd, Kandutsch şi Stimpfling (317) au folosit ca sursă de celule sarcomul I de şoarece, pe cînd Ogburn şi colab. (464) au pornit de la celule limfatice ganglionare şi splenice normale de iepure. În al doilea rînd, metoda de testare a eliminării a fost diferită: lipsa de sinteză a unui produs care era normal să fie sintetizat ca urmare a transferării unor celule, în speţă anticorpi anti-*Shigella* (464), faţă de lipsa de creştere a celulelor tumorale şi producerea de anticorpi hemoaglutinanţi dependenţi de *locus*-ul H-2 la şoarece (317). În al treilea rînd, în experinţele lui Ogburn şi colab. (464), pare a interveni un întreg grup de antigene,

Scanned with OKEN Scanner

dacă ţinem seama de eterogenitatea genetică a iepurelui faţă de diferenţierea antigenică strictă care există la liniile pure de şoareci, care se deosebesc între ele numai prin structura genetică a *locus*-ului H-2. Asemănarea dintre cele două antigene constă în faptul că dau reacţii imunologice care duc la eliminarea celulelor alogenice transferate.

Existenţa a două fracţiuni antigenice, una solubilă în mediu salin şi cealaltă solubilizabilă cu ajutorul veninului de şarpe, poate fi explicată printr-o eventuală variaţie a raportului lipide/proteine din complexele scindate cu triton X-100. Analizele chimice au arătat că fracţiunea solubilizabilă prin venin de şarpe conţine 20% fosfolipide, pe cînd fracţiunea solubilă în mediu salin numai 8%, conţinutul în azot fiind însă aproximativ acelaşi (10 şi, respectiv, 9%) (464).

Fracţiunea solubilizabilă prin venin de şarpe avînd o putere antigenică mai mare decît fracţiunea solubilă în mediu salin, se poate presupune că fosfolipidele au un rol foarte important în determinarea antigenicităţii. Caracterul de lipoproteină al antigenului tisular incriminat în declanşarea mecanismului de eliminare a celulelor alogenice transferate la iepuri este, de asemenea, în concordanţă cu observaţii recente ale altor cercetători asupra caracterului lipoproteic al particulelor antigenice izolate din celule normale de şoarece (283, 317) sau din celule tumorale la acelaşi animal (162, 374). Acestea provoacă eliminarea accelerată a grefei ulterioare de piele (283, 370), determină creşterea titrului de hemaglutinine (162, 183) sau produc inhibiţia hemaglutinării (283, 370).

În afara lucrărilor lui Kandutsch şi colab. (315, 316, 317), în ultimii 2 ani s-au publicat şi alte date asupra relaţiilor dintre antigenele de histocompatibilitate ale şoarecilor şi complexele lipoproteice (73, 188, 305, 372—375). Dintre acestea, cele mai interesante par a fi datele lui Manson şi colab. (372—375), care au studiat lipoproteinele microzomale la şoareci. În acest scop, ei au folosit limfoblaştii de şoareci DBA/2, L-5178 Y, deoarece aceste celule au putut fi crescute *in vivo* în forme ascitice şi au putut fi cultivate cu uşurinţă *in vitro*. Rezultatele obţinute în cercetarea acestei linii celulare au fost aplicate şi în investigaţia antigenelor ţesuturilor normale. În primele studii asupra unor extracte de celule leucemice de la şoareci L-5178 Y, obţinute după dezintegrarea acestor celule cu ajutorul ultrasunetelor (373), antigenele sensibilizante faţă de homografă au fost depistate în fracţiuni conţinătoare ale unor structuri subcelulare. Fracţionarea omogenatelor celulare într-un recipient cu azot sub presiune (305) a permis să se demonstreze că activitatea sensibilizantă faţă de homografă este legată de o fracţiune lipoproteică (374). Această fracţiune este insolubilă în soluţie de sucroză 1,3 M, are o densitate de aproximativ 1,19 şi provoacă următoarele reacţii: sensibilizează şoarecele, în sensul declanşării eliminării accelerate a homografei de piele, induce formarea de anticorpi şi se combină specific cu hemaglutininele şi citotoxinele. Fracţionarea omogenatelor celulare prin procedeele convenţionale (375) a arătat că lipoproteina antigenică se află în fracţiunea microzomală, celelalte fracţiuni subcelulare fiind lipsite de activitate antigenică. Densitatea preparatului activ, obţinut astfel, este de 1,135, iar doza minimă activă pentru un şoarece, exprimată în echivalenţi de proteină, este de 50 μg (tabelul 13). Examinată la microscopul electronic, această fracţiune a prezentat multiple structuri veziculare, asemănătoare acelora observate în preparate similare de

Scanned with OKEN Scanner

Ernster şi colab. (188). Prin studii de densimetrie s-a constatat că ea este relativ omogenă şi că are o densitate apropiată de densitatea cea mai ridicată a lipoproteinelor serice.

Tabelul 13

Activitatea componentei lipoproteice, izolată din fracţiuni subcelulare de la şoareci L-5178 Y, în testul de sensibilizare faţă de homografa de piele *

Sursa lipoproteinei	Doza pentru un animal (g)	Numărul de animale	Timpul mediu de supravieţuire a homografei (zile)
Microsomală	0,010	14	9,4±0,7
	0,025	9	8,4±1,0
	0,050	17	6,5±0,8
	0,100	17	7,2±0,6
Nemicrosomală	0,100	4	8,7±0,7
	0,250	9	8,8±0,5
	0,500	7	8,3±0,6
	1,00	6	9,8±0,5
Control	—	14	9,4±0,6

* După Manson şi colab. (372)

Încercările de a se izola fracţiunea lipoproteică antigenică din ţesuturi normale (splină, timus, ficat şi rinichi) ale unor şoareci din linia genetică DBA/2 au condus la constatarea că o asemenea fracţiune există numai în splină şi timus şi că ea lipseşte din ficat şi rinichi (tabelul 14). Doza sensibilizantă minimă de lipoproteină microzomală splenică este de 0,025 g proteină,

Tabelul 14

Activitatea lipoproteinelor microzomale din diferite ţesuturi ale şoarecilor din linia genetică DBA/2 ca antigene de transplantare *

Ţesutul	Doza pentru un animal (g)	Numărul de şoareci	Timpul mediu de supravieţuire a homografei de piele (zile)
L1-5178y	0,25	9	7,2±0,3
	0,50	19	6,1±0,3
Splină	0,25	7	7,1±0,6
	0,50	5	7,3±0,6
Timus	0,25	5	5,7±1,0
	0,50	5	6,0±1,0
Ficat	0,25	4	9,3±0,5
	1,00	9	9,0±0,6
	10,00	10	9,2±0,7
Rinichi	1,00	6	9,8±0,8
Control	—	7	9,3±0,7

* După Manson şi colab. (372)

Scanned with OKEN Scanner

care corespunde unei cantități de preparat uscat de 0,042 g. Doza de antigen lipoproteic de 0,025 g proteină sau doza de 0,042 g preparat antigenic uscat corespunde unui număr de aproximativ 5×10^6 celule splenice. Specificitatea preparatului a fost demonstrată prin administrarea sa la animale de control. Comparativ, s-a urmărit eficacitatea antigenică a unor cantități variabile de celule splenice vii pentru a se putea raporta activitatea antigenului purificat la aceea a celulelor vii (tabelul 15).

Tabelul 15

Activitatea celulelor splenice ale șoarecilor din linia genetică DBA/2 în inducerea rejecției accelerate a unei homografe de piele *

Doză de celule ($\times 10^6$) pentru un animal	Ziua transplantării pielii după tratament	Numărul șoarecilor	Timpul mediu de supraviețuire a homografei (zile)
Control	—	36	9,2±0,4
1	4	13	8,2±0,6
2	4	14	7,4±0,6
3	4	23	6,9±0,5
4	4	8	6,1±0,6
5	4	13	6,7±0,5
2	7	8	8,2±0,7
4	7	8	8,3±0,3
5		11	8,3±0,3
10		6	6,5±0,3

* După Manson și colab. (372)

Așa cum reiese din tabelele 14 și 15, doza minimă sensibilizantă de celule vii este de $2—3 \times 10^6$ celule, ceea ce înseamnă că preparatul antigenic lipoproteic reprezintă cam 50% din puterea antigenică a celulei întregi.

Proprietățile imunogenetice ale lipoproteinelor microzomale. În activitatea sensibilizantă a lipoproteinei microzomale splenice sînt incriminate ambele antigene atît antigenul de *locus* H-2, cît și antigenul nelegat de acest *locus*, în timp ce în cazul antigenului lipoproteic izolat din celulele L-5178 Y este implicată dependența de *locus*-ul $H\text{-}2^K$ (372).

Unul din obstacolele principale în purificarea și caracterizarea antigenelor de transplantare este insolubilitatea lor. Solubilizarea cu detergenți alterează proprietățile preparatului lipoproteic microzomal (163), așa cum se întîmplă și după solubilizarea cu tripsină sau butanol (369). Alterarea antigenului este mai puțin importantă după tratament cu soluții alcaline, dar în acest caz se obține numai o semisolubilizare a preparatului (399). Singura metodă recomandabilă de solubilizare a antigenelor de transplantare este aceea utilizată de Kandutsch și Stimpfling (317), care a fost menționată mai înainte. Trebuie subliniat însă că preparatul antigenic al acestor autori a avut alt scop și a fost testat cu ajutorul altor metode: s-a folosit homografa tumorală drept țintă și s-au utilizat ca teste de antigenicitate formarea de hemaglutinine și potențarea creșterii homografei tumorale, care diferă mult de rejecția accelerată a homografei de piele normală.

Scanned with OKEN Scanner

Davies (164, 165) a încercat solubilizarea cu butanol sau izobutanol a antigenelor de transplantare. Analiza preparatului antigenic nativ a evidenţiat prezenţa următorilor compuşi: colesterol, esteri de colesterol, mono-, di- şi trigliceride şi o cantitate relativ mare de fosfolipide. După solubilizarea sa cu butanol nu s-au mai găsit colesterol şi esteri de colesterol, iar concentraţia celorlalte lipide a scăzut mult. Apreciat pe baza gradientului de sedimentare, preparatul antigenic, solubilizat, apare omogen, 85% avînd S_{20} de 56, iar greutatea moleculară fiind de ordinul 8×10^6. Testele de antigenicitate au sugerat atît prezenţa antigenului condiţionat de *locus*-ul H-2, cît şi a antigenului necondiţionat de acest *locus*. Dizolvarea lipoproteinei antigenice în medii alcaline la cald îi conferă un spectru de absorbţie ridicat în ultraviolet, cu absorbţia maximă la 257—258 mμ. Un compus fosforat se asociază părţii proteice a preparatului iniţial. După eliminarea acestui compus (prin tratarea sa în soluţie alcalină cu acid percloric 20%) apare în soluţie un nucleotid al cărui spectru de absorbţie în ultraviolet este similar cu acela al guanozin-5-monofosfatului. Acest nucleotid prezintă o reacţie la orcinol pozitivă pentru riboză, iar dozarea cantitativă a acesteia a arătat că în preparatul astfel obţinut există o moleculă de riboză pentru fiecare echivalent de guanină. Conţinutul de nucleotid a fost apreciat la un mol nucleotid-guanină pentru 9,6 g proteină delipidată.

După cum s-a semnalat mai sus, unii autori (176, 375) au sugerat că antigenele de histocompatibilitate, găsindu-se în fracţiunea microzomală, ele sînt constituenţi normali ai reticulului endoplasmic. Un alt argument în favoarea acestei ipoteze este adus de observaţia potrivit căreia, în timpul omogenizării ţesuturilor, dezintegrarea nucleilor celulari este incompletă şi generează variaţii ale concentraţiei de lipoproteine din extractul tisular. Dacă celulele se omogenizează la o presiune de azot joasă, care lasă nucleii intacţi, cantitatea de lipoproteine microzomale este mai mică aproape cu 50% faţă de aceea obţinută la presiuni mari de azot, cînd membrana nucleară se distruge mai uşor. Microscopia electronică celulară (470) a demonstrat că reticulul endoplasmic este ataşat atît de membrana celulară, cît şi de membrana nucleară, ceea ce ar explica creşterea cantităţii de lipoproteină prin distrugerea membranei nucleare. Reticulul endoplasmic este locul sintezei active de proteine în celulă. Un atac imunologic asupra antigenelor care iau naştere într-o structură atît de importantă a activităţii celulare ar putea motiva distrugerea rapidă şi violentă a unei homografe, mai ales cînd diferenţa genetică între receptor şi donator este mare şi condiţionează, în consecinţă, antigenele puternice (cum sînt cele de *locus* H-2 la şoarece).

11. ANTIGENELE LEUCOCITARE LA DIFERITE SPECII ANIMALE, INCLUSIV OMUL, ŞI LEGĂTURA LOR CU ANTIGENELE DE TRANSPLANTARE

Observaţia lui Medawar (398), potrivit căreia injecţiile intradermice de leucocite sanguine intacte sînt la fel de eficace în inducerea sensibilităţii faţă de o homografă de piele la iepure ca şi aplicarea homografei însăşi, a făcut posibilă folosirea acestei surse celulare, uşor de obţinut, pentru studiul antigenelor de transplantare la diferite specii de animale (61, 63, 77). Extinderea

Scanned with OKEN Scanner

acestor cercetări la oameni de către Friedman şi colab. (215) a sugerat că metoda este aplicabilă pentru investigaţia antigenelor de transplantare la om. Rapaport şi colab. (492) au urmărit în acest sens activitatea biologică şi aspectele ultrastructurale ale diferitelor fracţiuni subcelulare ale leucocitelor sanguine umane, folosite ca antigen de transplantare la om. Aceşti autori au studiat răspunsul faţă de homografa de piele la 42 de oameni voluntari, după tratamentul lor prealabil cu leucocite intacte, leucocite dezintegrate sau diferite fracţiuni leucocitare. Fiecare receptor a fost injectat intradermic pe suprafaţa deltoidului cu cantităţi cunoscute de leucocite intacte sau de fragmente leucocitare suspendate în 4 ml soluţie fiziologică de NaCl. În acelaşi mod s-au administrat fracţiunile nucleare sau citoplasmice. După 2 săptămîni s-a aplicat o homografă de piele de la acelaşi donator şi o homografă de control de la un al treilea om normal, urmărindu-se dacă se manifestă sau nu eliminarea accelerată a homografei de piele de la donatorul de leucocite. S-a cercetat activitatea antigenică a următoarelor preparate: leucocite intacte (10×10^8 celule), leucocite dezintegrate mecanic, fracţiunea nucleară, fracţiunea mitocondrial-granulară, fracţiunea bogată în microzomi şi fracţiunea citoplasmică fibrilară rămasă după centrifugări repetate. Aceleaşi preparate au fost folosite şi în studiile de ultrastructură. Aceşti autori (215, 492) au obţinut rezultate deosebit de interesante şi anume:

a) Leucocitele intacte, administrate în prealabil, induc eliminarea accelerată sau de tip grefă albă a pielii la un număr însemnat de receptori, dacă se utilizează doze variind între 64×10^7 şi 57×10^4 leucocite. Ultima valoare reprezintă doza cea mai mică a activităţii leucocitelor intacte ca antigene de transplantare. Faptul că este suficientă o cantitate mică de leucocite în inducerea sensibilităţii la homografa de piele concordă, de altfel, cu observaţia altor autori (474) asupra capacităţii omului de a dezvolta o hipersensibilitate marcată după expunere la doze relativ reduse de antigen. Receptorii sensibilizaţi cu doze mari de leucocite prezintă o incidenţă mai mare de rejecţii de tip grefă albă şi un număr mai însemnat de reacţii încrucişate cu grefele de control, ceea ce demonstrează existenţa unei legături între doza antigenului de transplantare folosit şi tipul de răspuns la homografa de piele a receptorului sensibilizat (495), fenomen semnalat într-o altă secţiune a acestui capitol.

b) Leucocitele distruse şi tratate cu dezoxiribonuclează, injectate receptorului în doze comparabile cu acelea folosite în cazul celulelor intacte, determină fie o grefă albă, fie rejecţia accelerată a grefei de piele, fie rejecţia sa normală, în 10—12 zile.

c) Inocularea nucleilor leucocitari intacţi ($4{,}4—4{,}8\times10^8$ nuclei) provoacă de asemenea eliminarea accelerată (în 4—5 zile) a homografelor de piele în majoritatea cazurilor. Fracţionarea acestor nuclei duce la pierderea acestei proprietăţi, iar receptorii cărora li se administrează fragmente nucleare diferit preparate elimină grefele de piele în mod normal (în 13—19 zile).

d) S-a încercat sensibilizarea receptorilor cu diferite fracţiuni citoplasmice leucocitare. Atît fracţiunea mitocondrio-granulară, cît şi cea microzomală sau supernatantul citoplasmic cu fragmente fibrilare realizează sensibilizarea receptorilor în 60% din cazuri, homografele ulterioare de piele fiind eliminate mai ales sub formă de grefă albă şi numai rareori sub forma tipică de eliminare accelerată (în 4 zile). Păstrarea fracţiunilor leucocitare la —20°

Scanned with OKEN Scanner

înainte de folosire nu modifică de loc capacitatea lor de a induce la receptori sensibilitatea față de homografa de piele. De asemenea, nici liofilizarea nu pare a altera puterea lor antigenică.

e) Supernatantul cu fragmente fibrilare, obținut după sedimentarea tuturor fragmentelor subcelulare, inclusiv microzomii, se poate separa apoi prin dializă în două fracțiuni care se comportă diferit: fracțiunea cu particule fibrilare s-a dovedit a fi antigenică, iar fracțiunea solubilă, clară, dializabilă s-a dovedit lipsită de antigenicitate.

Studiile ultrastructurale (fig. 31) arată că fracțiunea mitocondro-granulară (*A*) conține un număr mare de mitocondrii intacte, granule și fragmente de membrană, cu o lungime de la 150 mμ pînă la cîțiva microni, că fracțiunea microzomală (*B*) conține numeroși microzomi, reticul endoplasmic și fragmente de membrană și că ultima fracțiune (*C*) conține numeroase fibrile foarte fine care ar putea aparține fie reticulului endoplasmic, fie membranelor. Componenta comună a celor trei fracțiuni citoplasmice active ca antigene de transplantare este deci de origine reticulară sau membranoasă. Fracțiunea leucocitară activă ca antigen de transplantare se află legată de particulele citoplasmice și nu de fracțiunea solubilă și dializabilă. Acest fapt este caracteristic pentru antigenul de transplantare. Dimpotrivă, în cazul transferului de hipersensibilitate de tip întîrziat față de antigene bacteriene sau fungice la om, chiar și dializatul clar leucocitar are această proprietate (341). Așadar, pe baza acestor observații s-ar putea presupune că „factorul de transfer" care mediază eliminarea homografelor la om ar putea fi separat de antigenele de transplantare prezente în aceeași celulă (493). Pare de asemenea interesant faptul că înghețarea și dezghețarea consecutivă, în repetate rînduri, sau liofilizarea nu diminuează capacitatea fracțiunilor citoplasmice leucocitare de a induce sensibilitatea față de homografe la om, spre deosebire de ceea ce se întîmplă cu antigenele de transplantare ale altor specii (de exemplu, șoarecii) (4). Faptul că fragmentele nucleare își pierd proprietățile antigenice sub influența unor factori diverși a fost evidențiat de numeroși autori (61, 279, 398, 469) la diferite specii animale. Studiile electronooptice sugerează de asemenea că factorul comun al fracțiunilor antigenice este de origine membranoasă, ceea ce concordă cu observațiile efectuate prin alte metode pe diverse specii de mamifere (161, 176, 283, 315, 403, 408, 423, 427, 429, 619).

Pe baza acestor date experimentale se poate susține existența unei legături între antigenele de transplantare și antigenele leucocitare la om. Existența unei asemenea legături are o deosebită importanță teoretică și practică, pentru că, pe de o parte, ea oferă posibilitatea investigării antigenelor de transplantare prin determinarea grupelor leucocitare, iar pe de altă parte permite realizarea unei tipizări a donatorilor (adică permite descoperirea donatorului celui mai apropiat de receptor din punctul de vedere al histocompatibilității) prin determinarea grupelor leucocitare ale unor donatori disponibili, diverși și a receptorului. Izolarea fracțiunilor leucocitare capabile să inducă sensibilizarea față de homografe sau a acelora care ar putea evidenția o asemenea stare de sensibilitate printr-o reacție intradermică, asemănătoare intradermoreacției la tuberculină, ar avea o deosebită importanță practică pentru depistarea perechilor celor mai adecvate de receptor-donator de grefă (287, 495). Teoretic,

Scanned with OKEN Scanner

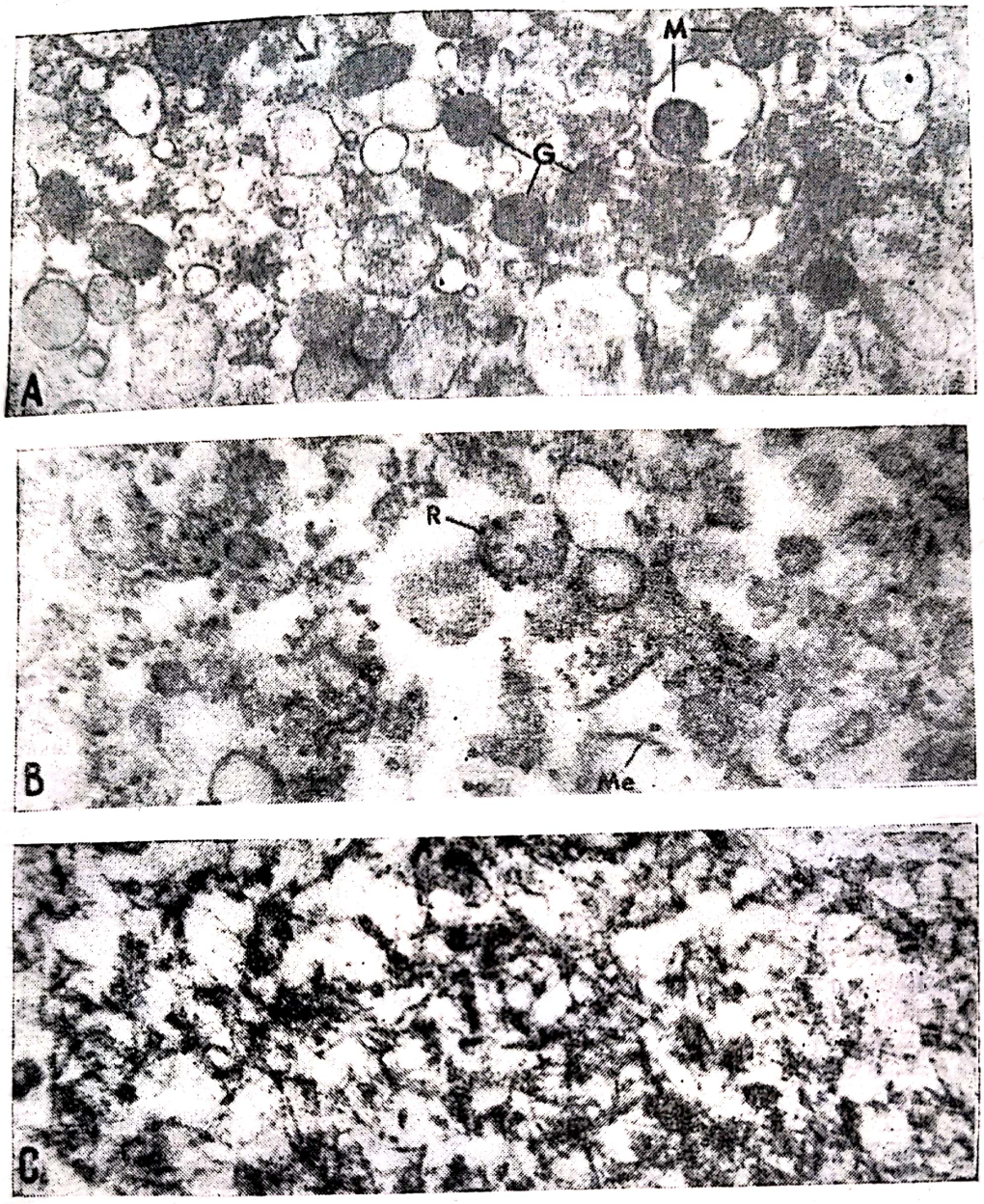


Fig. 31. — Imagini electronooptice ale unor fracţiuni citoplasmice leucocitare cu activitate de antigen de transplantare:

A — fracţiunea mitocondrio-granulară (sedimentul citoplasmic obţinut la 20 000 g) conţine mitocondrii (*M*), granule leucocitare (*G*), membrane şi material amorf (× 30 000); *B* — fracţiunea microzomală (sedimentul obţinut la 105 000 g). Unii dintre microzomi (*R*) sînt încă ataşaţi la membrane, sugerînd că ei reprezintă componente ale reticulului endoplasmic. În această fracţiune se văd de asemenea fragmente de membrane (*Me*), granule mici şi material amorf, asociat adesea cu aceste fragmente de membrane (× 90 000); *C* — fracţiunea fibrilară (sedimentul citoplasmic obţinut la 198 000 g) constă mai ales din fibrile fine, dintre care unele nu măsoară mai mult de 30 Å în diametru. În această fracţiune se observă şi mici fragmente de membrane (× 90 000) [după Rapaport şi colab. (492)].

izolarea acestor fracţiuni leucocitare ar da posibilitatea ca prin pretratament corespunzător şi/sau desensibilizare să se amelioreze sau să se suspende procesul eliminării homografelor (339, 492, 494).

Scanned with OKEN Scanner

Rapaport şi colab. (492, 494) au folosit diverse preparate leucocitare în cercetările lor asupra antigenelor din aceste celule la oameni (voluntari), cărora, după 7—14 zile de la administrarea preparatelor, li s-au aplicat grefe de piele de la donatorul de leucocite şi de la un donator indiferent. În cele ce urmează se prezintă cîteva caracteristici privind preparatele antigenice leucocitare utilizate de autorii citaţi:

a) **Leucocitele intacte ca antigene de transplantare.** Leucocitele intacte induc sensibilizarea faţă de homografe în doză minimă de 567 000 celule. Pentru doze cuprinse între $5{,}67 \times 10^5$ şi 5×10^7 celule, sensibilitatea gazdei faţă de ţesutul transplantat se manifestă printr-o eliminare accelerată a grefei-test şi o eliminare primară, normală, a grefei de control (tabelul 16). În cazul folosirii unor doze mai mari de leucocite ($1—6{,}4 \times 10^8$ celule), grefa-test este eliminată ca o grefă albă, iar grefa de control suferă o eliminare de tip accelerat, ceea ce sugerează că reacţia încrucişată la grefa de piele, pusă în evidenţă la indivizii hipersensibilizaţi, poate fi mai curînd expresia unei stări condiţionate de calea de administrare şi doza de antigen decît consecinţa unor apropieri de histocompatibilitate între donator şi receptor, aşa cum au presupus unii autori (495).

Tabelul 16

Inducerea sensibilităţii la homografe prin administrarea leucocitelor intacte *

Doza de leucocite	Intervalul dintre administrarea leucocitelor şi grefarea pielii (zile)	Timpul de supravieţuire a grefei de piele (zile)	
		Test	Control
64×10^7	14	4—5	6—7
$42{,}2 \times 10^7$	14	Grefă albă	7—8
$42{,}2 \times 10^7$	7	4	5—6
$42{,}2 \times 10^7$	21	Grefă albă	5
18×10^7	12	Grefă albă	6
10×10^7	12	Grefă albă	Grefă albă
5×10^7	12	4—5	10
$2{,}58 \times 10^7$	12	4—5	6—7
$1{,}28 \times 10^7$	12	5—6	6—7
$6{,}42 \times 10^6$	12	6—7	8—9
$1{,}29 \times 10^6$	12	4—5	6—7
$5{,}67 \times 10^5$	14	4—5	12—13
$3{,}37 \times 10^5$	14	10	13—14

* După Rapaport şi colab. (494)

b) **Fracţiunile leucocitare ca antigene de transplantare.** Extractele leucocitare se prepară, de obicei, prin cicluri repetate de îngheţare-dezgheţare şi prin tratament cu dezoxiribonuclează. Ele au fost folosite ca surse de antigen cu rezultate interesante. De exemplu, din cinci receptori de homografe de piele cărora li s-au administrat înainte asemenea extracte leucocitare, trei au eliminat homografa-test ca o grefă albă sau în chip accelerat, iar ceilalţi doi au prezentat o eliminare normală, de grefă primară, în timp ce, din cele şapte grefe de control aplicate aceloraşi receptori, numai la trei s-a înregistrat o descreştere a timpului de supravieţuire a grefei (tabelul 17). Îngheţările şi

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 17

Inducerea sensibilității față de homografă prin administrarea unor extracte leucocitare realizate prin înghețări-dezghețări repetate și tratament cu dezoxiribonuclează *

Doza de leucocite	Interval dintre administrarea extractului și grefarea pielii (zile)	Timpul de supraviețuire a grefei de piele		
		Test	Control	Control
66×10^7	14	Grefă albă	6—7	—
66×10^7	14	5—6	6—7	—
60×10^7	*	10	12	9—10
60×10^7	*	11	12	—
60×10^7	*	Grefă albă	4	12

* Extracte din 20×10^7 leucocite au fost injectate receptorului în zilele 1, 14 și 28, grefa de piele fiind aplicată în ziua 28 [după Rapaport și colab. (494)].

dezghețările repetate și tratamentul cu dezoxiribonuclează nu inactivează total antigenul leucocitar de transplantare, ci produce numai o ușoară scădere a activității sale.

Izolarea fracțiunilor subcelulare din omogenate de leucocite este posibilă, utilizînd coeficientele de sedimentare ale nucleilor, mitocondriilor, microzomilor și fracțiunii solubile (127, 203, 617). Trebuie menționat însă că modul de omogenizare a celulelor influențează în mod deosebit antigenicitatea fracțiunilor subcelulare leucocitare. În omogenatele obținute cu ajutorul omogenizatorului Potter-Elvehjem, fracțiunea nucleară deține activitatea antigenică, dar fracționarea nucleului în continuare este urmată de pierderea antigenicității (tabelele 18 și 19).

Tabelul 18

Activitatea antigenului de transplantare a fracțiunilor nucleare leucocitare, obținută prin metoda Potter-Elvehjem *

Fracțiunea nucleară	Doza de leucocite	Timpul de supraviețuire a grefei de piele (zile)	
		Test	Control
755 × g PPT	124×10^7	14	12
755 × g SPT	62×10^7	19	17
198 000 × g PPT	62×10^7	14	13
198 000 × g SPT	62×10^7	16	16

* PPT=precipitat; SPT=supernatant. Intervalul pînă la aplicarea grefei=14 zile [după Rapaport și colab. (494)].

Injectarea unei singure doze din fracțiunea citoplasmică nu induce sensibilizarea față de homografe, dar această stare se provoacă prin administrarea repetată a unor doze mici din această fracțiune.

Prepararea fracțiunilor subcelulare prin omogenizare cu ajutorul omogenizatorului Vir Tis a modificat repartiția activității antigenice: în acest caz, fracțiunea citoplasmică și nu nucleul concentrează activitatea antigenică. Cele

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 19

Activitatea antigenului de transplantare a fracţiunilor leucocitare obţinute prin metoda Potter-Elvehjem *

Fracţiunea folosită	Doza de leucocite	Timpul de supravieţuire a grefei de piele (zile)
Nuclei întregi	44×10^7	4
Nuclei întregi	42×10^7	4
Nuclei întregi	48×10^7	4—5
Supernatantul în întregime	180×10^7	14
Mitocondrii	63×10^7	12
Mitocondrii	66×10^7	13
Mitocondrii	52×10^7	13
Microzomi	63×10^7	15
Microzomi	66×10^7	14
Microzomi	52×10^7	18
Fracţiune solubilă (105 000 g)	20×10^7	15—16
Fracţiune solubilă (105 000 g)	20×10^7	15—16

* După Rapaport şi colab. (494)

trei fracţiuni citoplasmice (mitocondriile, microzomii şi fracţiunea solubilă) au activitate antigenică puternică, egal repartizată între ele (tabelul 20).

Tabelul 20

Activitatea antigenelor de transplantare în fracţiunile subcelulare leucocitare, obţinute prin metoda Vir Tis *

Fracţiunea folosită	Doza de leucocite	Timpul de supravieţuire a grefei de piele (zile)	
		Test	Control
Nuclei întregi	80×10^7	15	16
Mitocondrii	80×10^7	grefă albă	6—7
Microzomi	80×10^7	grefă albă	4
Fracţiune solubilă	40×10^7	grefă albă	12
Fracţiune solubilă	40×10^7	4	9
Fracţiune solubilă	20×10^7	grefă albă	11

* După Rapaport şi colab. (494)

Aceste rezultate neconcordante asupra localizării antigenului de transplantare în fracţiuni subcelulare leucocitare pot fi explicate prin legătura acestuia cu reticulul endoplasmic, fapt în sprijinul căruia numeroşi autori au prezentat argumente (161, 176, 283, 368, 375, 391, 619).

Antigenele de transplantare din leucocite au fost puse în evidenţă cu certitudine. Pînă în prezent nu se ştie precis în ce măsură ele sînt sau nu sînt cuplate cu antigenele leucocitare determinante de grup, care pot fi detectate *in vitro* prin teste serologice (leucoaglutinine, consum de antiglobulină etc.). Dacă există, într-adevăr, o relaţie genetică directă sau o corelaţie oarecare

Scanned with OKEN Scanner

între antigenele leucocitare de grup şi antigenele leucocitare de histocompatibilitate, devine posibilă, aşa cum s-a mai arătat, tipizarea histocompatibilităţii perechilor de donator-receptor pe baza compatibilităţii leucocitare şi, deci, devine posibilă selecţionarea donatorilor celor mai compatibili faţă de receptor pentru prelevarea homografei.

12. ANTIGENELE ERITROCITARE DE GRUP ÎN MECANISMELE TRANSPLANTĂRII

Asupra acestei probleme, observaţiile prilejuite de homotransplantarea organelor şi ţesuturilor la om nu sînt suficient de cocludente. În alt capitol sînt prezentate aceste observaţii. Aici menţionăm numai cîteva date experimentale în legătură cu această problemă, care pare a avea o semnificaţie deosebită.

a) **Antigenele eritrocitare de grup la păsări şi legătura lor cu imunitatea de transplantare şi imunotoleranţă.** La păsări se cunosc cel puţin 10 sisteme de grup sanguin (93, 224), iar *loci*-i care determină antigenele acestor sisteme sînt consideraţi în majoritatea lor ca fiind independenţi (segregaţi). Schierman şi Nordskog (514) au arătat că la puii de găină *locus*-ul B de grup sanguin funcţionează ca un *locus* major de histocompatibilitate. Aceste antigene B se găsesc nu numai în eritrocite, ci şi în limfocite (515). De asemenea, antigenele sistemului C de grup sanguin se găsesc în eritrocite şi limfocite şi *locus*-ul C are proprietăţi de histocompatibilitate (516), dar acest sistem este mai slab decît sistemul B.

În privinţa celorlalte sisteme de grup sanguin (A, E, D şi L) nu s-a putut demonstra legătura lor cu histocompatibilitatea (516) şi nici nu s-au regăsit aceste antigene în limfocite. Injectarea repetată de cantităţi mari de eritrocite de grup B nu induce însă la nou-născuţi toleranţa faţă de grefa ulterioară de piele de la un donator incompatibil de grup sanguin B. Leucocitele grupului sanguin B produc o asemenea toleranţă.

b) **Grupele sanguine şi legătura lor cu histocompatibilitatea la iepuri.** Medawar (396) a susţinut că grefele de piele între iepuri nu declanşează formarea de hemaglutinine şi că incompatibilitatea de grup sanguin are o influenţă neglijabilă asupra supravieţuirii grefei de piele la aceste animale. Reluînd studiul grefei sanguine la iepuri, Cohen şi colab. (128) au făcut constatări interesante. Ei au găsit că există la iepuri antigene de grup sanguin care au un rol important în supravieţuirea grefei de piele şi anume antigenele legate de *locus*-ul Hg, care antigene sînt relativ puternice. Incompatibilitatea de grup sanguin nu afectează însă timpul de supravieţuire a grefei secundare de piele. Diferenţele de grup sanguin pentru tipurile B, H şi L nu au rol în supravieţuirea grefelor de piele. În unele cazuri, imunizarea prealabilă a receptorului de grefă (grupul sanguin F) cu eritrocite de la donatorul de grefă determină prelungirea supravieţuirii grefei de piele şi nu o eliminare accelerată cum era de aşteptat, dar nu s-a putut găsi o explicaţie satisfăcătoare pentru acest fenomen.

c) **Grupele sanguine şi importanţa lor în homotransplantele de măduvă osoasă la cîine.** S-a observat că la cîini iradiaţi letal, homotransplantele de

Scanned with OKEN Scanner

măduvă osoasă de la donatori indiferenţi au o durată lungă de supravieţuire într-un procent mai mic de 10% (591). Prin administrarea de măduvă osoasă autoloagă, procentul de supravieţuire a transplantului creşte la 90—100% (282). Thomas şi colab. (592) au transplantat la receptori canini după iradiere letală măduvă osoasă (alogenă) de la donatori ale căror antigene eritrocitare au fost testate pentru compatibilitate şi au obţinut supravieţuirea a patru animale din zece, pe cînd la alte zece cazuri la care antigenele eritrocitare nu s-au testat au supravieţuit trei animale. Rezultatele obţinute nu par a fi însă deosebit de semnificative şi, ca atare, legătura dintre antigenele de grup sanguin şi cele de histocompatibilitate la cîine nu poate fi susţinută cu certitudine.

C. ANTICORPII DE TRANSPLANTARE

Problema reacţiei comune responsabile de eliminarea grefelor a constituit subiectul a numeroase discuţii în controversă, care s-au întins de-a lungul ultimului deceniu şi care sînt departe de a fi încheiate.

Majoritatea faptelor pledează în favoarea ipotezei, conform căreia eliminarea grefei se datoreşte unui mecanism de hipersensibilizare întîrziată, asemănător reacţiei la tuberculină, mediată de celulele mononucleare sensibilizate (64). Centrul controverselor a fost rolul anticorpilor celulari, sesili şi al celor umorali, serici, în reacţia de eliminare a grefelor. Prezenţa acestor două tipuri de anticorpi în cursul eliminării homografelor a fost demonstrată experimental, dar ceea ce nu s-a precizat exact este gradul de responsabilitate a fiecărui tip de anticorpi în procesul de eliminare.

În general a existat tendinţa de a se considera anticorpii serici ca un coprodus al grefelor, utilizabili numai ca un indicator al răspunsului imun. În sprijinul acestei ipoteze s-au adus o serie de fapte experimentale. Totuşi, excluderea totală a participării anticorpilor serici în eliminarea grefei s-a dovedit a fi dificilă (316).

Adaptarea la studiul eliminării unor metode serologice sensibile, concepută de Gorer şi colab. (17, 237), a permis să se demonstreze că ţesuturile transplantate declanşează producerea de anticorpi serici propriu-zişi, care pot fi recunoscuţi (într-adevăr cu multă dificultate) datorită capacităţii lor de a aglutina hematiile şi leucocitele donatorului. Ulterior s-a demonstrat că aceşti anticorpi au şi activitate citotoxică (77, 257).

1. ANTICORPII UMORALI DE TRANSPLANTARE LA ŞOARECI

Prin folosirea unor metode serologice s-a putut demonstra apariţia mai multor tipuri de anticorpi serici în organismul animalelor receptoare de homotransplante, în cursul eliminării acestora. În cele ce urmează sînt prezentaţi aceşti anticorpi serici.

a) **Hemaglutininele.** Gorer (238, 240) a descoperit la şoarecii care au eliminat tumorile provenite de la o altă linie genetică de şoareci, prezenţa unor hemaglutinine serice faţă de eritrocitele animalelor donatoare.

Pe baza unei metode preconizată de Gorer şi Boyse (244), Amos şi colab. (16) au demonstrat prezenţa hemaglutininelor serice la şoarecii care au

eliminat homografe de piele. Stimpfling (583), îmbunătăţind tehnica iniţială prin introducerea polivinilpirolidonei (PVP), ca diluant al antiserurilor, ceea ce a permis eliminarea serului heterolog ca diluant şi necesitatea de a absorbi în prealabil aglutininele naturale nespecifice, a mărit sensibilitatea şi specificitatea reacţiei. Titrurile obţinute astfel au fost semnificative şi persistenţa anticorpilor hemaglutinanţi în ser s-a desfăşurat în timp pe mai multe săptămîni.

Folosindu-se însă diferite combinaţii de linii de şoareci, s-a observat că, în unele sisteme, anticorpii hemaglutinanţi nu devin evidenţi decît după ce reacţia de eliminare a grefei este foarte avansată (239, 574) şi s-a emis ipoteza că anticoprii umorali apar tardiv şi, deci, nu pot fi incriminaţi în mecanismul de eliminare a grefelor. O altă explicaţie posibilă ar fi că aceşti anticorpi sînt legaţi rapid de antigenele donatorului, pe măsură ce ei sînt sintetizaţi în organism, şi în consecinţă, nu pot fi identificaţi decît după ce celulele transplantate sînt eliminate.

Pentru lămurirea acestor alternative, Moore (431) a urmărit titrul hemaglutininelor pe două loturi de şoareci: un prim lot la care grefa de piele a fost lăsată să se elimine normal şi un al doilea lot la care s-a efectuat excizia grefei, înainte ca eliminarea ei să se manifeste (grefele fiind recoltate de la acelaşi donator). Excizarea chirurgicală a produs o creştere accelerată a titrului hemaglutininelor în ser. Aplicîndu-se, consecutiv, mai multe grefe de la acelaşi donator, s-a observat că după fiecare dintre ele apare o scădere precoce şi tranzitorie a titrului hemaglutininelor. Explicaţia pe care o impun aceste observaţii este că anticorpii hemaglutinanţi circulanţi sînt legaţi rapid, după apariţia lor, de către grefă şi, ca atare, nu pot fi identificaţi *in vitro* decît după excizia chirurgicală a grefei sau după eliminarea ei. Prezenţa hemaglutininelor în serul şoarecilor receptori de homografe de piele se datoreşte, probabil, faptului că, la aceste animale, acelaşi *locus* H determină atît antigenele de histocompatibilitate, cît şi antigenele majore de grup sanguin (240) şi deci, ar fi normal ca între cele două antigene să existe o strînsă legătură, dacă nu chiar o identitate.

b) **Anticorpii citotoxici.** Mai mulţi autori (242, 243, 247, 252) au demonstrat că ţesutul limfatic şi alte ţesuturi, normale sau tumorale, ale şoarecilor sînt sensibile la acţiunea citotoxică exercitată de izoanticorpii generaţi de antigenele *locus*-ului H-2. Reacţia lor de răspuns la acţiunea acestor izoanticorpi are loc atît *in vivo*, cît şi *in vitro; in vivo* ea este asociată direct cu eliminarea grefelor. În cursul eliminării grefelor la şoareci apar, deci, anticorpi citotoxici, provocaţi de antigenele determinate de *locus*-ul H-2, care este gena majoră de histocompatibilitate la aceste animale.

În cazul tumorilor, Boyse şi colab. (83) au arătat că sensibilizarea celulară specifică şi formarea de anticorpi nu pot fi considerate ca mecanisme imune, distincte şi independente şi că ele sînt condiţionate de tipul tumorilor şi de răspunsul acestora faţă de anticorpii H-2 atît *in vitro*, cît şi *in vivo*.

c) **Alţi anticorpi serici.** În serul şoarecilor imunizaţi la homografe de piele sau mai descris anticorpi leucoaglutinanţi şi hemolizine (14, 15, 286). Terasaki [citat de (598)] a descris limfoaglutinine faţă de sîngele donatorilor la puii de găină, care au eliminat grefe de piele. Anticorpi fixatori de

Scanned with OKEN Scanner

complement au fost găsiți de Batchelor (40) în serul șoarecilor hipersensibilizați cu țesuturi tumorale. Simonsen (543, 544) nu a găsit o creștere specifică a complementului seric la cîini cu homotransplant renal; el a observat numai o creștere tranzitorie, la 3—4 zile de la transplantare, pe care a atribuit-o unui răspuns nespecific al organismului. Rezultatele au fost confirmate și de alți autori (193, 434). Tot Simonsen (543) a urmărit dacă se pot evidenția anticorpi incompleți prin metoda aglutinării cu albumină serică bovină sau testul direct al lui Coombs. Dintre patru animale studiate, la unul, căruia i s-a practicat un transplant de splină, au apărut aglutinine detectabile prin acest test, pe cînd la celelalte trei animale, purtătoare de homotransplant renal, reacția a fost dubioasă. În continuare, același autor (544) a imunizat cîini receptori, de grup sanguin A^-, cu injecții intravenoase de sînge total sau cu eritrocite spălate, necontaminate cu leucocite, de la un cîine-donator de grup sanguin A^+. El a obținut titruri ridicate de aglutinine anti-A în serul receptorilor. După 2—10 zile de la ultima injecție, a transplantat receptorilor un rinichi de la donatorul de sînge (A^+). În 2 cazuri, rinichiul a fost eliminat în mod accelerat, titrul anticorpilor anti-A din serul acestor cîini rămînînd însă nemodificat. Reimplantarea rinichiului la donatorul corespunzător (după ce a fost ținut timp de o oră în organismul receptorului imunizat) a fost urmată de necrozarea lui în 4 zile, fenomen care nu a apărut la animalele de control neimunizate.

Muirhead și Goves (433) au găsit că testul direct al lui Coombs este pozitiv și se însoțește de anemie și fragilitate crescută a hematiilor la cîinii cu homotransplant renal. În acest caz, testul se pozitivează după 5—10 zile, în timp ce întreaga simptomatologie de eliminare apare după 14—26 zile. Fenomene asemănătoare s-au găsit și la cîinii cu transplant de splină.

Experiențele menționate nu sînt însă concludente pentru a putea fi folosite ca argumente în sprijinul legăturii directe dintre reacția de transplantare și prezența anticorpilor incompleți, care s-ar putea explica prin intervenția mai multor factori: a) globuline neimune derivate din grefa în curs de eliminare și atașate hematiilor gazdei; b) imunoglobuline care s-au dispus pe suprafața eritrocitelor și acționează ca anticorpi antieritrocitari autoimuni; c) alterări directe ale hematiilor sub acțiunea unor produse de absorbție.

Eyquem și Oudot (189) au evidențiat pozitivarea testului lui Coombs la capră în a 5-a zi după efectuarea unui homotransplant de splină la vasele gîtului, titrul maxim de anticorpi fiind atins după 10 zile. În serul unui astfel de receptor s-au evidențiat și titruri joase de anticorpi prin testul indirect al lui Coombs. Simonsen (543, 544) a atras atenția asupra faptului că acești autori (189) nu au reușit să dovedească specificitatea reacției, deoarece un organ în curs de dezintegrare poate elibera constituenți globulinici diferiți de anticorpii specifici de grup.

Abeyounis și colab. (1) au propus detectarea anticorpilor de transplantare cu ajutorul metodei de aglutinare mixtă, pe culturi de țesuturi în strat unicelular (191, 290, 409). Ei au lucrat pe șoareci cu homotransplante de piele din liniile genetice C3H/He și C57BL/6J. Ca antigen *in vitro* au folosit celule fibroblastice din cultura de celule 929L, obținute inițial dintr-un șoarece din linia C3H de către Earle (180). S-a efectuat aglutinarea mixtă (409),

Scanned with OKEN Scanner

folosindu-se ca antigen cultura de țesut, ca anticorpi serul de la șoarecii cu homotransplant de piele și ca sistem indicator hematii umane de grup O amestecate cu antiser de șoarece față de hematii umane. Rezultatele sînt redate în tabelul 21.

Tabelul 21

Rezultatele testului de aglutinare mixtă efectuat cu celule -L- și seruri de șoarece obținute la 3 săptămîni după grefa de piele *

	Numărul de seruri cu titrul menționat de anticorpi					
Titrul de anticorpi	⩽10 și 10	30	90	270	810 și peste	Total
C57BL grefat cu C3H	0	0	1	2	9	12
C57BL grefat cu C57BL	5	0	0	0	0	5
C3H grefat cu C57BL	11	2	0	0	0	13

* După Abeyounis și colab. (1)

Experiențele au demonstrat că anticorpii pot fi detectați în serul receptorului începînd din ziua a 9-a și că persistă 45 de zile. Retransplantarea pielii de la donator (C3H) la receptor (C57BL) a provocat o creștere a titrului de anticorpi. În aceste experiențe s-a folosit o linie celulară stabilită dinainte. Experiențe ulterioare au indicat însă că și culturile primare de celule dau aceleași rezultate.

Din această enumerare rapidă a cercetărilor privind anticorpii umorali generați după transplantarea țesutului reiese că la șoareci, hemaglutininele sînt de un interes deosebit și că un oarecare interes prezintă de asemenea anticorpii citotoxici din serul acestor animale. Specificitatea lor și legătura directă cu fenomenul de eliminare a grefelor s-a demonstrat cu certitudine (16, 245).

2. ANTICORPII UMORALI DE TRANSPLANTARE LA IEPURE, ȘOBOLAN ȘI CÎINE

Numeroși autori (9, 15, 30—32, 85, 119—121, 151, 215, 243, 264, 265, 267, 318, 321, 389, 396, 403, 452, 483, 543, 640, 649) au urmărit apariția anticorpilor umorali și la alte specii de animale în afară de șoarece. S-a arătat că, în cazul liniilor pure de șoareci, prezența hemaglutininelor în serul receptorilor de grefe se explică prin aceea că majoritatea antigenelor de histocompatibilitate sînt și antigene majore de grup sanguin sau sînt foarte strîns legate de acestea. O astfel de observație a condus la căutarea unei reacții similare și la alte specii de animale, pentru a se stabili dacă hemaglutininele și, eventual, anticorpii citotoxici ar putea fi considerați ca un indicator general al reacției de histocompatibilitate.

Kapitchnikov și colab. (318) au urmărit prezența hemaglutininelor și a anticorpilor citotoxici la iepure și șobolan, prin practicarea consecutivă a cîte două grefe de piele de la același donator. Folosind linii pure de șobolan, ei au urmărit de asemenea existența unor anticorpi eventuali față de antigenul

Scanned with OKEN Scanner

de histocompatibilitate legat de cromozomul sexual Y (grefe de la donator mascul la receptor femelă). Cercetările acestor autori, alături de acelea ale altora, au înlesnit acumularea unor date interesante asupra acestor probleme:

a) În cazul serurilor izoimune de iepure, activitatea citotoxică și activitatea hemaglutinantă nu se asociază în mod obligatoriu, ceea ce permite ca la aceste animale să se încrimineze antigene diferite, specifice, în reacția de hemaglutinare și în activitatea citotoxică. Majoritatea antigenelor de histocompatibilitate la iepure sînt prezente în limfocite și absente în hematii. Cele mai numeroase antigene de grup sanguin nu s-au dovedit a fi și antigene determinante de histocompatibilitate sau, dacă sînt într-adevăr, au o forță foarte slabă. Din acest punct de vedere nu există asemănare între șoarece și iepure, la cel din urmă neexistînd un echivalent al *locus*-ului H-2 de la șoareci. Subdivizarea antigenului murin în două antigene distincte, antigenul T (de transplantare) și antigenul H (de hemaglutinare), propusă de Medawar (396) a fost infirmată de Brent și colab. (85). Însă există, fără îndoială, în cazul iepurelui un izoantigen H, capabil de a induce formarea hemaglutininelor, dar nefuncționînd ca barieră efectivă de histocompatibilitate și un antigen T, prezent în celulele nucleate, ca limfocitul, și absent sau prezent în cantități neglijabile în eritrocit. Aceste rezultate au fost confirmate și de alți autori (257).

b) La șobolan nu s-au detectat hemaglutinine după grefe de piele practicate între animale de sexe diferite, dar în aceeași linie genetică (CFN). Grefele între sexe diferite și între animale din linii genetice diferite (de exemplu, mascul din linia LE și femelă din linia CFN) de asemenea nu au produs hemaglutinine serice. La șobolani de sexe diferite din linia genetică Lewis s-a obținut un titru foarte slab de anticorpi (1 : 4) la un receptor din 10, titru care a apărut în a 9-a zi de la grefare și s-a anulat după 15 zile. Nici unul din șobolanii investigați nu a prezentat activitate citotoxică în ser față de suspensia limfocitară a donatorului. În cazul grefelor reciproce de piele între animalele din linia genetică BN și linia Lewis, Ballantyne și Stetson (32) au observat că anticorpii umorali diferă foarte mult între ei atît ca titru, cît și ca persistență în timp. Receptorii Lewis au anticorpi citotoxici în ser încep̂ind din ziua a 6-a de la grefare, dar titrul rămîne mic și scade foarte mult după 26 de zile. Receptorii BN nu au anticorpi circulanți în ziua a 6-a de la grefare, ci mult mai tîrziu, însă titrul lor continuă să crească după 26 de zile. Dimensiunea grefei nu are legătură cu titrul anticorpilor serici, deși unii autori (30, 31, 121, 649) au arătat că grefa de piele masivă la șobolani, acoperind o treime din suprafața corpului, supraviețuiește mai mult decît grefele mici. Această supraviețuire prelungită, paradoxală, se desfășoară cu toată evidența serologică a unui răspuns imun activ (32) și se datorește, probabil, unui alt factor limitativ decît anticorpii citotoxici din ser.

c) Anticorpii serici la cîine au de asemenea cîteva particularități. Grupele sanguine canine diferă de cele umane, cîinii fiind lipsiți de izoanticorpi naturali (120, 640). Acest animal poate fi imunizat relativ ușor față de un antigen eritrocitar specific. Se cunosc cinci antigene eritrocitare canine, nomenclatura folosită în enumerarea lor neavînd legătură cu nomenclatura umană respectivă (tabelul 22).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 22

Distribuţia grupelor sanguine la cîinii de curte

Grupa sanguină	Distribuţia (în procente)
A	63*
B	6
C	99
D	27
E	80

* Grupul sanguin A are două subdiviziuni: A_1 (cu o distribuţie de 44,6%) şi A_2 (cu o distribuţie de 19,0%) [după Christian şi colab. (120)].

Practic, numai antigenele A şi C produc în mod regulat un titru semnificativ de hemaglutinine în cursul imunizării. În experienţe asupra relaţiilor dintre hemaglutinine şi reacţia la homografa de piele sau rinichi, practicate la cîine, Altman şi Simonsen (9) au folosit antigenul A şi hemaglutininele anti-A. Potrivit acestor experinţe, expunerea grefelor de piele şi rinichi la titruri mari de anticorpi hemaglutinanţi, generată de antigenele eritrocitare ale donatorului de grefă, nu micşorează durata de supravieţuire a grefelor. În cazul pielii, serul conţinînd anticorpi a fost aplicat chiar în patul grefei, iar în cazul rinichiului, organul transplantat a fost perfuzat cu acest ser. Rezultatele au fost aceleaşi fie că s-a practicat, fie că nu s-a practicat imunizarea prealabilă a receptorului cu antigene eritrocitare de la donator. Simonsen (543) a preimunizat cîinele-gazdă cu sînge total de la viitorul donator şi a practicat apoi un homotransplant renal. În această situaţie a avut loc o eliminare accelerată a rinichiului, dar, conform opiniei acestui autor, fenomenul nu s-ar datora hemaglutininelor, ci anticorpilor tisulari, generaţi în organismul receptorului ca răspuns la acţiunea leucocitelor introduse cu ocazia imunizării animalului cu sînge total.

În cazul cîinelui nu se poate susţine existenţa unei legături între antigenele de grup sanguin şi cele de histocompatibilitate. Mai mult, se pare că la cîine imunitatea de transplantare nu are specificitate de individ strictă, ca la alte specii animale (de exemplu, şoarece sau şobolan), fenomen deosebit de important, deoarece este similar cu un alt fenomen semnalat la om de către Friedman şi colab. (215). La cîine antigenele de transplantare sînt diseminate între numeroşi indivizi (573).

Receptorul canin produce anticorpi umorali citotoxici, independent de hemaglutinine, iar aceştia nu interferează ca acţiune cu hemaglutininele (9, 321). Declanşarea şi desfăşurarea eliminării accelerate a rinichiului transplantat la un cîine, preimunizat cu eritrocite de la donatorul de organ, se datoreşte contaminării acestora cu un număr redus de leucocite (309, 321).

Bazaţi pe ipoteza lui Nelson (452) asupra înrudirii antigenice dintre donator şi receptor şi a reacţiei încrucişate a anticorpilor care apar la receptor după aplicarea unei homografe (ipoteză asupra căreia se va reveni în altă parte), Hager şi colab. (264) au demonstrat cu ajutorul testului de imunoaderenţă că în cursul procesului de eliminare, anticorpii se găsesc nu numai pe suprafaţa celulelor grefei care se elimină, ci şi pe suprafaţa celulelor diver-

Scanned with OKEN Scanner

selor țesuturi ale receptorului. Ei au arătat de asemenea că trombocitele canine sînt purtătoare de antigene, capabile de a sensibiliza gazda față de o homografă de rinichi, prelevată de la donatorul de trombocite și aplicată ulterior.

Mai tîrziu, cu ajutorul aceluiași test s-au făcut observații suplimentare asupra rolului anticorpilor și complementului în eliminarea obișnuită, primară, a unei homografe de rinichi (265). Astfel, s-a constatat că anticorpii sînt prezenți la suprafața celulelor țesuturilor, care urmează să fie eliminate prin mecanismul de eliminare de tip primar sau secundar, chiar înainte ca procesul să înceapă a se dezvolta. Celulele grefei reacționează în testul de imunoaderență, iar țesuturile omogenizate ale altor organe ale receptorului fixează complementul, fenomene care nu apar în țesutul renal normal. În timpul eliminării homografei renale, prin testul de imunoaderență s-a putut demonstra prezența anticorpilor pe celule din rinichiul gazdei (cînd aceasta nu a fost nefrectomizată) și pe trombocite.

Anticorpii de transplantare pot fi eluați din țesutul renal în curs de eliminare cu ajutorul unor soluții saline hipertonice și menținuți într-o fază fluidă. Ei reacționează *in vitro* cu antigenul plachetar al donatorului de grefă, antigen care poate sensibiliza gazda față de o grefă ulterioară de rinichi. Acești anticorpi eluați de pe țesuturile în curs de eliminare prezintă o afinitate specială pentru antigenele donatorului, dar reacționează și cu antigenele gazdei sau cu ale altor animale din cadrul aceleiași specii. Teoretic, reacția încrucișată a acestor anticorpi cu celulele gazdei poate explica sensibilizarea celulelor sale față de acțiunea litică, imună, a complementului propriu și apariția unui sindrom de „sinucidere" imunologică. Anticorpii eluați de pe celulele rinichiului care se elimină fixează complementul, cînd se află în combinație cu antigenele donatorului de grefă. Prezumtiv, orice reacție a anticorpilor care fixează complementul pe antigenul de la suprafața celulelor ar trebui să dea o liză imună a acestor celule, dacă substraturile pentru activitatea fracțiunilor C′3 și C′4 ale complementului sînt prezente în membrana celulară. Sinuciderea imunologică sau distrugerea celulelor gazdei prin anticorpii săi proprii, elaborați împotriva unui antigen din afară, asemănător însă cu propriile sale antigene celulare de suprafață [ipoteză emisă de Nelson (452)] a fost observată și descrisă și de alți autori. Această ipoteză de explicare a fenomenului de eliminare a homografei, prin imunizarea receptorului cu antigene asemănătoare celor din propriile sale țesuturi, reacția încrucișată a anticorpilor antigrefă cu țesuturile gazdei și distrugerea grefei prin acțiunea complementului este sprijinită de numeroase fapte. Astfel, Terasaki și colab. [citați de (598)] au descris prezența limfoaglutininelor la puii de găină, după o imunizare intensă cu homografe de piele și reacția acestor anticorpi cu celulele proprii ale gazdei; Merril și colab. (403) au semnalat distrugerea citolitică a limfocitelor receptorului sensibilizat după homografe de piele la iepure. De asemenea s-au evidențiat și alte fapte în favoarea acestei ipoteze: prezența anticorpilor de transplantare pe trombocite și leucocite la oamenii cu sindrom grefă-contra-gazdă și eliminare de grefă renală (265), liza histiocitelor gazdei în timpul eliminării grefelor tumorale (15), lipsa de viabilitate a 17—22% din celulele splenice ale șoarecilor care elimină homografe de piele (243), distrugerea limfocitelor proprii în cursul eliminării homografelor diverse (119, 151, 389, 483).

Scanned with OKEN Scanner

3. ANTICORPII UMORALI DE TRANSPLANTARE LA OM

Investigația capacității unor celule din sîngele și țesuturile umane de a forma anticorpi s-a putut realiza cu precizie numai după ce Algire și colab. (7) au descris și folosit camerele de difuziune, care permit cultivarea *in vivo* a acestor celule. Acești autori (7) au arătat că dezvoltarea culturilor celulare umane în camerele de difuziune are loc în bune condiții prin implantarea lor la receptori murini. În felul acesta se poate urmări formarea de anticorpi față de un antigen-test în aceste culturi de celule heterologe din camerele de difuziune.

Gengosian (220) a studiat culturile a patru tipuri de țesut hematopoietic (ganglioni limfatici, splină, măduvă osoasă și celule albe sanguine periferice), urmărind sinteza de anticorpi a acestor culturi față de un antigen-test de *S. thyphosa* cu care suspensiile celulare au fost amestecate *in vitro* înainte de introducerea lor în camerele de difuziune și în cavitatea abdominală a șoarecilor. S-a putut induce formarea de anticorpi în culturile de celule ganglionare limfatice și de celule splenice din camere de difuziune plasate la șoareci, titrul maxim fiind atins în culturile de 14 zile. Prin testul de dublă difuziune în gel Ouchterlony s-au evidențiat în serul acestor șoareci două proteine serice umane, o γ- și o β2M-globulină, iar prezența anticorpilor în culturi s-a putut evidenția prin metode imunohistochimice. S-a constatat că aceste culturi celulare sintetizează și anticorpi antigazdă murină, care au fost detectați în fluidul camerelor de difuziune ca hemaglutinine antișoarece.

Prezența anticorpilor serici în homotransplantul de piele la om s-a investigat cu ajutorul unor teste serologice diferite, dar rezultatele au fost destul de neconcludente. Semnalăm în această privință lucrarea lui Pavková și Dolezalová (479), care au obținut unele date prin metoda aglutinării cu colodiu (615, 616) la bolnavi cu arsuri și traumatisme mecanice cărora li s-au aplicat homografe de piele. Studiul a fost făcut pe 16 bolnavi dintre care 13 suferiseră arsuri grave de gradul al III-lea, iar 3 suferiseră diferite traumatisme mecanice. Ca antigen s-a folosit un extract salin din pielea grefei, serul recoltîndu-se de la receptorul de grefă la intervale de 2—8 zile de la operație. Cu valori semnificative s-au considerat titrurile mai mari de $^1/_8$. Titruri pozitive de anticorpi serici au apărut după 13—16 zile de la transplantare, prezentînd o curbă ascendentă, care a variat mult între ziua a 6-a și a 30-a. Manifestarea clinică de eliminare a apărut totdeauna la cîteva zile după ce fusese atins titrul maxim al anticorpilor. După acest moment culminant, titrul anticorpilor a scăzut în mod gradat, menținîndu-se în unele cazuri, la valori joase timp de 77 de zile de la operație. Bolnavii cu arsuri au avut anticorpi în titru mai mare decît cei cu traumatisme mecanice. Controlul specificității reacției s-a făcut pe 20 de oameni normali, la care titrurile de anticorpi nu au depășit $^1/_2$. Din cele 16 cazuri, titruri pozitive la anticorpi, precoce sau tardive, s-au obținut în 15 cazuri, celui de al 16-lea bolnav aplcîndu-i-se o grefă de piele prelevată de la un frate geamăn.

Anticorpi serici la grefe de piele efectuate după arsuri grave au găsit și Clarkson și Gorer (126) la copii. Însă, în toate aceste cazuri, atît la adulți, cît și la copii, pot fi implicați și alți factori, în afară de grefă, din cauza prezenței arsurilor.

Scanned with OKEN Scanner

Colombani şi colab. (135) nu au găsit anticorpi serici leucoaglutinanţi la receptori de grefă de piele, iar încercările lor de a transfera sensibilitatea la homografă cu ajutorul serurilor receptorilor sensibilizaţi nu au reuşit (343).

De asemenea, Kuhns şi colab. (333) au făcut investigaţii sistematice la oameni sensibilizaţi faţă de homografe de piele prin injectarea unor preparate leucocitare. La receptori umani sensibilizaţi cu leucocite, cărora li s-au aplicat apoi grefe de piele prelevată de la acelaşi donator, s-au demonstrat două tipuri de răspuns în formarea de anticorpi serici. Din 13 combinaţii de donatori-receptori cu incompatibilitatea de grup sanguin A—O sau A—B, la 12 receptori s-au găsit titruri joase de anticorpi de tip 7 S, care au fost activi faţă de eritrocitele şi leucocitele donatorului de grup A. Incompatibilitatea de grup sanguin A—O şi A—B justifică posibilitatea apariţiei acestor anticorpi.

La 6 din 17 bolnavi care mai întîi au fost trataţi cu leucocite intacte şi apoi, au primit o grefă de piele, de la acelaşi donator, s-a detectat un al doilea tip de auto- şi izoanticorpi, care nu a putut fi corelat cu nici unul din cele 26 de tipuri sanguine de anticorpi cunoscute. Aceşti anticorpi neidentificaţi au prezentat titruri joase, au reacţionat atît la temperaturi scăzute, cît şi la 37° şi au avut o durată în ser de 3 săptămîni. Este interesant de semnalat că ei au reacţionat faţă de eritrocitele donatorului, dar nu şi faţă de leucocitele sale. Aceşti anticorpi nu s-au regăsit la receptorii de fracţiuni leucocitare, ci numai la acei bolnavi care au primit leucocite întregi, viabile. Rolul lor este greu de precizat, dar titrul scăzut şi durata scurtă a existenţei lor sînt argumente împotriva faptului că antigenul responsabil de prezenţa lor are un rol major în histocompatibilitate.

4. ANTICORPII TISULARI

Majoritatea datelor experimentale şi clinice au arătat că eliminarea homografelor de ţesuturi şi organe reclamă prezenţa unor celule limfoide intacte. Transferul pasiv al imunităţii de transplantare pentru grefe de piele şi alte ţesuturi solide s-a putut realiza cu uşurinţă prin celule limfatice sensibilizate în prealabil (59, 74, 423), şi nu prin antiseruri, deci nu prin anticorpi umorali (56, 59, 67, 85, 423, 573). Aceste fapte au impus concluzia că eliminarea homografelor este un fenomen imunologic mediat în primul rînd de celule, analog cu reacţiile de hipersensibilitate de tip întîrziat (85). Datele experimentale de care dispunem pînă acum au pus în evidenţă încă două fapte: prezenţa unor anticorpi umorali al căror rol în mecanismul de eliminare este foarte disputat (268, 332, 440, 580, 581) şi rolul principal al anticorpilor legaţi de celule şi al sensibilizării de tip întîrziat în acest mecanism (338, 344, 502).

a) **Rolul sistemului limfatic în imunitatea de transplantare; răspunsul imun primar şi secundar.** Importanţa ţesutului limfatic în producerea anticorpilor este cunoscută de mulţi ani. Răspunsul acestui ţesut la un antigen injectat depinde, printre altele, de calea de administrare. Astfel, injecţiile de bacterii, vaccinuri sau alte antigene solubile, pe cale intradermică sau subcutanată, evocă sinteza anticorpilor, în special la nivelul ganglionilor de drenare a locului de injectare. Se consideră astăzi că principalul producător de

Scanned with OKEN Scanner

anticorpi este plasmocitul imatur. În ganglionul limfatic, dezvoltarea cea mai intensă a plasmocitelor are loc în medulară și numai într-o mică măsură în zona de joncțiune a corticalei cu medulara. O a doua injecție de antigen determină apariția mai multor celule plasmatice decît prima injecție. De altfel, acesta este motivul repetării administrării antigenului în vederea stimulării producerii anticorpilor.

Cunoștințele noastre despre mecanismul celular și interacțiunile celulare posibile care asigură formarea anticorpilor sînt însă încă fragmentare atît în ceea ce privește anticorpii umorali, cît, mai ales, în ceea ce privește anticorpii tisulari.

S-a putut dovedi existența unui răspuns imun în ganglionii limfatici, care drenează homografele de piele (59) și alte homografe de țesuturi proaspete la șoareci (416). Studii histologice pe iepuri au demonstrat prezența celulelor activate în ganglionii drenanți ai grefei de piele, os, țesut renal, măduvă osoasă roșie și cartilaj (105, 109, 110, 147, 240, 490, 519, 531). S-a observat la șoareci că, după prima grefă de piele se produce o ușoară mărire a ganglionilor limfatici regionali, cu apariția a numeroase celule mari pironinofile în țesutul limfatic difuz din corticală. Scothorne și McGregor (531) au adoptat termenul de celulă limfatică mare, pentru a desemna celulele mari de 15—17 μ, care predomină în corticala ganglionilor limfatici drenanți ai homografelor de piele și au atras atenția asupra asemănării acestei celule cu celula considerată ca producătoare de anticorpi. Burwell (107) a confirmat pe iepuri prezența acestor celule și a celulelor limfocitare medii pironinofile în ganglionii drenanți ai homografelor unor țesuturi diferite.

Reacția ganglionului limfatic este generată în mod evident de pătrunderea antigenului de transplantare pe cale limfatică; ea este, deci, un răspuns imun primar. André și colab. (20) au urmărit răspunsul morfologic al sistemului limfatic la iepuri normali în cursul răspunsului imun primar al acestora la homografele de piele, căutînd să evidențieze baza celulară a imunității de transplantare. Răspunsul morfologic la homografe se localizează, în primul rînd, în nodulii limfatici adiacenți locului unde s-a aplicat grefa. Imunitatea de transplantare se însoțește de modificări proliferative, care încep în ganglionii locali și se extind treptat la ganglionii distali și splină. Reacția celulară precede eliminarea grefei și se continuă mult timp după ce ea a fost redusă la o escară.

În cazul cînd se aplică o a doua grefă (grefa secundară), reacția morfologică a nodulilor limfatici și a splinei reprezintă un veritabil răspuns anamnestic. Stabilirea succesiunii modificărilor morfologice, ca urmare a practicării grefei primare și grefei secundare, s-a putut determina printr-o serie de metode histologice și histochimice (colorație Wright-Giemsa, colorație cu verde de metil-pironină, colorație Schiff cu acid periodic, colorație cu acridin oranj, colorație Feulgen, colorație pentru fosfataze alcaline etc.). După aplicarea grefei primare apar modificări morfologice importante. În primele patru zile după grefare se produce un edem infiltrativ al grefei cu invazie de limfocite. Din ziua a 4-a pe secțiunea ganglionilor limfatici apare o creștere marcată a centrilor germinativi, ca urmare a unei proliferări de celule nediferențiate, cu caracter de hemocitoblaști. Din ziua a 6-a reticulul primitiv devine foarte

Scanned with OKEN Scanner

evident atît în centrii medulari, cît şi în cordoanele medulare. Acest proces se extinde şi la ganglionii contralaterali, cu mărirea numărului hemocitoblaştilor (dacă, de exemplu, grefa primară se aplică la iepure pe suprafaţa exterioară a unei urechi, sînt afectaţi şi ganglionii contralaterali, adică ganglionii celeilalte urechi). În ziua a 9-a, leziunea atinge intensitatea maximă, ganglionii prezintă arii multiple, în care arhitectura celulară normală este înlocuită de o masă fără structură, formată din limfocite, reticulul primitiv se dezvoltă foarte mult, iar numărul hemocitoblaştilor ajunge la 4% faţă de 1%, proporţia întîlnită în condiţii normale. În această perioadă se produc modificări similare în splină. După 14 zile, modificările morfologice din ganglioni intră în remisiune şi reapar foliculii limfatici şi centrii germinativi. În sfîrşit, după 25 de zile, ganglionul satelit grefei revine la aspectul normal, ganglionul contralateral recăpătîndu-şi aspectul iniţial după 15 zile, iar splina după 20 de zile.

Deci, prima celulă care răspunde la antigenul de transplantare prezent în homografă ia naştere în centrul germinativ al ganglionului satelit grefei. În cazul homografei de piele, această celulă limfoidă este hemocitoblastul, o celulă tînără, cu diametrul de 12—15 μ şi cu nucleul mare înconjurat de un inel de citoplasmă moderat vizibilă. Cromatina nucleară a acestei celule este dispusă într-o reţea fină, delicată, asemănătoare cu aceea din celula reticulară normală, iar nucleolii nu sînt proeminenţi.

Pe măsură ce această celulă se maturează, diametrul ei se măreşte şi raportul nucleu/citoplasmă scade, citoplasma devine intens bazofilă, prezentînd totuşi o zonă perinucleară clară, iar nucleolii se disting cu uşurinţă. În stadiul următor al dezvoltării sale, celula scade în diametru, citoplasma devine foarte bazofilă şi prezintă zone vacuolare întinse; în nucleul dispus central, nucleolii nu mai sînt vizibili, iar reţeaua de cromatină rămîne încă fină.

Citochimic, hemocitoblastul are următoarele caracteristici: conţine o cantitate relativ mare de ARN, îi lipsesc granulaţiile de glicogen şi aminopolizaharide şi este intens pironinofil, spre deosebire de limfocitul normal care este slab pironinofil şi are numeroase granule de glicogen. Hemocitoblastul este, cu multă probabilitate, o celulă cu competenţă imunologică.

Efectul cortizonului, aplicat local sau parenteral, asupra răspunsului ganglionilor limfatici la grefa primară este de a reduce sau de a suprima apariţia celulelor limfoide mari în ganglionii regionali şi de a prelungi supravieţuirea grefei (528, 529). Dacă se injectează cortizonul subcutanat, între grefă şi ganglionii regionali, nu este influenţată nici apariţia celulelor limfoide mari, nici supravieţuirea grefei. Scothorne (528, 529) susţine că acest hormon este efectiv în special prin reducerea puterii grefei de a provoca răspunsul imun. Uremia severă la iepuri întîrzie apariţia primară a celulelor limfoide mari şi medii în ganglionii tributari teritoriului unde s-a aplicat grefa de piele (111). S-a emis ipoteza că modificarea reacţiei primare la homografe de piele în uremia severă se datoreşte interferenţei cu sinteza de proteine şi acizi nucleici în celulele formatoare de anticorpi din ţesutul limfatic (111).

Caracterul răspunsului imun secundar în ganglionii limfatici, ca urmare a repetării grefei de piele de la acelaşi donator a fost descris pentru prima dată de Mitchinson (421), pe grefe tumorale de şoareci. Acest autor a arătat că

Scanned with OKEN Scanner

ganglionii limfatici regionali, recoltați în timpul dezvoltării răspunsului imun secundar și transplantați la un alt șoarece din aceeași linie genetică, conferă gazdei o imunitate mai puțin completă, în comparație cu ganglionii limfatici regionali prelevați în cursul dezvoltării răspunsului imun primar și transplantați în aceleași condiții.

Modificările din ganglionii limfatici ai unui receptor, care prezintă un răspuns imun secundar, constau din mărirea considerabilă a volumului lor și din leziuni histologice și histochimice pe care André și colab. (20) le găsesc similare acelora din cursul răspunsului imun primar. Fenomenele apar însă mai precoce, sînt mai intense și persistă mai mult timp. În acest caz, un fapt interesant este apariția țesutului fibros perivascular, cu fibroblaști care au reacție pozitivă la verde de metilpironină. În grefă nu apar nici hemocitoblaști, nici plasmocite. Studiile pe iepuri cu mai multe grefe succesive de piele, de la același donator, au demonstrat că plasmocitele nu sînt caracteristice răspunsului limfatic, cînd se transplantează acest țesut.

Modelul experimental al grefelor de piele ortotopice, succesive nu este cel mai adecvat pentru studiul răspunsului imun ganglionar, primar și secundar, deoarece ganglionul poate fi modificat de pe urma antigenelor tisulare ale primei grefe sau de pe urma infecției consecutive eliminării acesteia.

De aceea s-au căutat alte modele experimentale, care să nu prezinte inconvenientele semnalate mai sus. Craigmyle (147) a propus ca transplantarea celei dintîi și a celei de a doua grefe să se facă într-o zonă subcutanată, astfel încît pielea de deasupra să se vindece de pe urma traumatismului chirurgical al implantării grefei. El a înserat o primă grefă de cartilaj costal subcutanat în urechea iepurelui și a urmărit modificările din ganglionii limfatici regionali, tributari teritoriului respectiv. Această grefă nu a modificat ganglionii limfatici, nici ponderal, nici citologic. Implantarea, după 4 zile, a unei a doua grefe de cartilaj de la același donator, în aceeași zonă a receptorului, a determinat o creștere moderată în greutate a ganglionilor limfatici regionali, cu apariția celulelor limfoide mari și mijlocii în corticala și medulara lor. Inconvenientul acestui model experimental constă în puterea antigenică slabă a cartilajului, care nu evocă răspunsul imun primar, astfel încît nu poate fi folosit pentru urmărirea răspunsului imun secundar. Burwell (107) a propus un alt model experimental și anume folosirea măduvei hematogene, care este puternic antigenică și care poate evoca un răspuns imun primar marcat în ganglionii limfatici.

El a practicat o inserție subcutanată în urechea iepurelui a unui fragment de os iliac de iepure, conținînd măduvă hematogenă puternic antigenică. Ca receptori a folosit iepuri giganți Flemisch, iar ca donatori iepuri Albino (106). Cu ajutorul acestui model experimental, el a reușit să semnaleze următoarele fapte în cadrul răspunsului imun primar:

Modificările de greutate. Ganglionii limfatici cresc rapid în greutate între a 2-a și a 6-a zi de la transplantarea pielii. Această creștere se observă și de partea ganglionilor ipsolaterali în ziua a 4-a, care este atribuită scurgerii anesteziculuí de la locul injecției.

Modificările microscopice. În ganglionul limfatic apar în număr mare celule limfoide mari și mijlocii atît în corticală, cît și în medulară. Numărul lor devine maxim la 5 zile după transplantarea pielii și revine la valoarea

Scanned with OKEN Scanner

normală după 14 zile. Aceste modificări apar precoce. La 42—58 de ore de la grefarea pielii au fost evidenţiate celule pironinofile nou-formate. În venulele postcapilare, celulele endoteliale prezintă creşteri ale volumului nuclear şi o pironinofilie citoplasmatică mai intensă. După Burwell (107), modificările acestor celule endoteliale se datoresc încorporării antigenelor ţesutului grefat din fluxul sanguin prin venule. Examenul reţelei vasculare intrinseci a ganglionilor limfatici a arătat că venulele postcapilare drenează nu numai fluxul sanguin capilar al cortexului, ci şi reţeaua de capilare subcapsulare, care se găsesc în legătură strînsă cu sinusul ganglionului.

În cadrul răspunsului imun secundar, Burwell (107) a descris următoarele fenomene:

Modificările de greutate. Ganglionii limfatici cresc mai repede în greutate şi ating volumul maxim mai curînd, comparativ cu grefa primară (de exemplu, unei creşteri medii din cursul răspunsului primar de 119 $\pm$ 17 mg la 7,9 $\pm$ 2,3 zile de la grefare îi corespunde în cursul răspunsului secundar o creştere medie de 189 $\pm$ 27 mg la 2,6 $\pm$ 0,4 zile de la grefare).

Modificările microscopice. Celulele limfoide mari şi mijlocii apar mai precoce. Distribuţia lor este predominant subcapsulară şi nu în tot cortexul, ca în cazul răspunsului imun primar. Centrii germinali devin mai mari şi mai numeroşi după a 5-a zi, în timp ce în cursul răspunsului imun primar, ei tind să dispară între a 4-a şi a 8-a zi de la grefare. Hiperplazia medularei ganglionare este mai precoce.

Examinate la microscopul electronic, celulele limfoide mari şi mijlocii se prezintă sub două tipuri ultrastructurale: a) celule cu particule dense, dispersate liber în citoplasmă; b) celule cu o membrană citoplasmică granulară organizată. Burwell (107) a presupus că primul tip de celule ar aparţine seriei limfocitare şi ar fi producătoare de anticorpi tisulari, pe cînd celălalt tip ar aparţine seriei plasmocitare şi ar produce anticorpi umorali.

Fără îndoială că pe baza acestor studii şi date experimentale se poate admite că rolul sistemului limfatic este evident în reacţia organismului faţă de homografe, dar cunoştinţele noastre asupra acestui aspect al imunităţii de transplantare sînt departe de a fi satisfăcătoare.

Sistemul limfatic nu este însă singurul sistem incriminat în acest proces complex şi nici măcar nu se poate afirma că este sistemul esenţial. Ganglionul limfatic drenant al grefei suferă cele mai mari modificări structurale, el este capabil prin celulele sale să transfere imunitatea de transplantare unui alt animal indemn şi, totuşi, el nu este factorul major în instalarea imunităţii receptorului faţă de homografă. Cea mai clară dovadă în acest sens este faptul că extirparea lui modifică foarte puţin durata de supravieţuire a grefei de piele. Izolarea unei grefe renale în aşa fel încît să fie ferită de contactul cu ţesutul limfatic nu modifică cu nimic sau modifică foarte puţin timpul necesar eliminării ei (10, 20).

După Medawar (396), ganglionul limfatic drenant susţine primul atac al antigenului. El a demonstrat că activarea ganglionului limfatic contralateral are loc ca urmare a circulaţiei sistemice a antigenului şi nu acţiunii locale secundare. Ganglionul limfatic drenant al grefei este capabil de a transfera unui alt animal imunitatea de transplantare numai pentru un timp de două

Scanned with OKEN Scanner

săptămîni (la şoarece), or, cum imunitatea activă a receptorului este de mai lungă durată, ea se datoreşte, deci, activării lente a altor centri limfatici din organism.

În cadrul acestei probleme trebuie menţionată de asemenea lucrarea lui Vrubel (614). El a urmărit modul în care se dezvoltă joncţiunea limfatică a grefei de piele cu patul său, rolul ganglionilor limfatici regionali în supravieţuirea grefei şi felul în care supravieţuieşte grefa după ce aceşti ganglioni au fost afectaţi, ca urmare a reacţiei grefă-contra-gazdă. Ca model experimental a folosit grefele de piele pe urechea de iepure. Acest autor (614) a constatat, în cazul grefei de piele, că joncţiunea secundară a grefei cu patul său se face foarte rapid după transplantare (între a 4-a şi a 5-a zi) şi, deci, antigenul de transplantare poate ajunge în ganglionii limfatici destul de curînd. Prin extirparea ganglionilor limfatici drenanţi ai grefei, Vrubel (614), spre deosebire de alţi autori, a obţinut o supravieţuire a grefei de piele de 23 de zile faţă de 11 zile, durata supravieţuirii ei cînd ganglionii limfatici sînt lăsaţi pe loc. Prin injectarea la baza urechii iepurelui a unei anumite cantităţi de azotiperită, supravieţuirea grefei creşte la 25 de zile. Vrubel (614) a reuşit să transfere imunitatea de transplantare unui alt animal, nu numai cu ajutorul celulelor limfatice ale ganglionilor regionali, ci şi prin administrare de celule splenice. Folosind ca test al imunităţii de transplantare durata de supravieţuire a grefei secundare (timpul de apariţie a eliminării accelerate de tip secundar, care este în medie de 4—5 zile), el a obţinut o amînare a eliminării grefei pînă la 18—19 zile, cînd a extirpat în prealabil ganglionii limfatici regionali şi splina (extirpare pe care a practicat-o după aplicarea primei grefe de piele şi înainte de aplicarea celei de a doua).

Numai suprimarea prealabilă a splinei nu prelungeşte supravieţuirea grefei secundare de piele. După extirparea ganglionilor limfatici regionali se produce în timp regenerarea patului limfatic, cu formarea altor ganglioni, care devin ganglioni regionali. Astfel, procesul imunologic poate fi întîrziat, dar nu suprimat. Mai înainte s-a arătat că în eliminarea homografei intervin cu siguranţă celulele limfoide intacte. Intervenţia lor este necesară şi în transferarea pasivă sau activă a imunităţii de transplantare, fapt care va fi prezentat în amănunt într-o secţiune următoare a acestui capitol. Berrian şi Brent (52) au propus termenul de anticorp „legat de celulă" pentru factorul care este activ în interiorul sau pe suprafaţa celulelor limfoide. Nu se ştie ce este acest anticorp. Se bănuieşte a fi o α-globulină, care este construită şi se comportă ca un anticorp circulant (486). Încercînd să elucideze acest fapt, o serie de cercetători (207, 240, 323, 324, 635) au investigat producerea şi localizarea anticorpilor în fracţiunile intracelulare ale celulelor limfatice ganglionare. Astfel, Kern şi colab. (323, 324) şi Gorer (240) au observat concentrarea activităţii anticorpilor în microzomii celulelor ganglionilor limfatici ai cobailor sensibilizaţi şi au urmărit cinetica secreţiei lor, interacţiunea între anticorpi şi microzomi şi distribuirea anticorpilor nou-formaţi. Fishman (207) a detectat anticorpi faţă de hematii de oaie în interiorul ribozomilor din celulele limfoide ale iepurilor sensibilizaţi în prealabil cu hematii de oaie. Wilson şi Crosby (635) au cercetat fracţiunile subcelulare ale ţesutului limfatic şi şoarecilor imunizaţi cu homografe de piele şi splină şi au urmărit activitatea citotoxică a diferitelor fracţiuni separate prin centrifugare din celulele limfatice

Scanned with OKEN Scanner

ale animalelor imunizate față de suspensii celulare viabile de limfocite și splenocite, obținute fie de la donator, fie de la receptor, fie de la un alt animal normal, dar dintr-o altă linie genetică. Rezultatele acestor autori (635) au dovedit că deși celula intactă, vie, are o activitate citotoxică evidentă, această activitate nu se regăsește constant în nici una din fracțiunile subcelulare. Fracțiunile nucleară și mitocondrială, precum și fragmentele de membrane sau supernatantul obținut după centrifugare au avut oarecare activitate citotoxică, dar pentru fiecare dintre ele ea a fost variabilă. În ceea ce privește specificitatea acestei activități, într-o serie de experiențe s-a găsit prezentă activitatea citotoxică a fracțiunilor nu numai față de celulele donatorului, ci și față de celulele animalelor din altă linie genetică, indiferentă, sau uneori chiar față de celulele receptorului. Ipoteza emisă pe baza acestor observații este că agentul citotoxic celular nu este un anticorp uzual, dovada suplimentară fiind și faptul că pentru a acționa, el nu reclamă prezența complementului în reacție.

b) **Transferul imunității de transplantare.** S-a menționat anterior că reacția receptorului față de homografă este o reacție imunologică specifică de transplantare. O caracteristică importantă a imunității de transplantare, dobîndită activ, este transmisibilitatea ei la animale indemne, de aceeași linie genetică. În acest sens sînt de menționat lucrările lui Billingham și colab. (59, 64), considerate clasice în acest domeniu. Acești autori au imunizat activ șoareci din linia genetică CBA prin homotransplante de piele de la șoareci donatori de grefe din alte linii genetice. Receptorii au fost considerați gazde primare. Apoi, s-a inoculat o altă serie de șoareci, tot din linia genetică CBA, cu anumite țesuturi de la șoarecii imunizați activ cu grefe de piele. Acești receptori au fost considerați gazde secundare. Gazdele secundare s-au comportat, după inoculare, ca și cum ar fi fost imunizate activ. Celulele care au avut capacitatea de a transmite imunitatea dobîndită a gazdelor primare la gazdele secundare au fost celulele ganglionilor limfatici regionali tributari grefei și, în mai mică măsură, splenocitele. Există mai multe căi de reacție a animalului-gazdă și dovadă este faptul că fenomenul de eliminare accelerată a celei de a doua grefe de piele de la același donator are loc chiar după extirparea ganglionilor limfatici regionali.

Această imunitate de transfer nu s-a obținut cu țesut ganglionar limfatic mort, cu ganglioni limfatici transplantați subcutanat, cu doze masive de sînge, de leucocite (însă asupra acestor celule există date în controversă asupra cărora se va reveni) sau de ser. Prin urmare, nu este vorba de un transfer pasiv de anticorpi preformați. Această stare nu se datorește nici unei imunizări active a gazdei secundare prin eventualul material antigenic original pe care l-ar fi putut conține celulele prelevate de la gazda primară, deoarece ea se manifestă la gazda secundară, chiar dacă aceasta este făcută, în prealabil, tolerantă față de antigenul care a imunizat gazda primară. Toate datele experimentale converg spre ipoteza conform căreia aceste celule transferate supraviețuiesc în gazda secundară un timp nelimitat, comportîndu-se la fel ca în organismul din care au provenit și că ele posedă un „factor de transfer" supus imunității de transplantare, care este strîns legat de celulă, și, în special, de celula vie.

Medawar (394) a fost primul cercetător care a demonstrat că eliminarea homografei de piele se face în mod accelerat, dacă receptorului i s-au admi-

Scanned with OKEN Scanner

nistrat, în prealabil, leucocite sensibilizate de la donator (donatorul fiind sensibilizat printr-o grefă de piele de la receptor). După un interval de timp, leucocitele sensibilizate ale donatorului, injectate la receptor, realizează un transfer activ al imunității de transplantare, evidențiat prin faptul că o homografă de piele este eliminată în mod accelerat. Potrivit acestor observații ale lui Medawar (394), leucocitele sînt, de asemenea, capabile să transfere imunitatea de transplantare. Lawrence și colab. (342, 346) au urmărit transferul sensibilității față de homografa de piele la om, tot pe baza testului eliminării accelerate, și au realizat transferul local sau sistemic al sensibilității față de această homografă folosind extracte de leucocite sanguine, obținute de la donatori sensibilizați în prealabil printr-o grefă cutanată de la receptor și tratată cu dezoxiribonuclează. Sensibilitatea transferată în acest mod este promptă și de durată. Dacă se realizează o hipersensibilizare activă a donatorilor de leucocite prin aplicări succesive de grefe cutanate de la receptor se observă un fapt paradoxal și anume: desensibilizarea donatorului față de grefele de piele ale receptorului, însoțite de desensibilizarea leucocitelor celui dintîi și, deci, de imposibilitatea de a realiza transferul de sensibilitate cu ajutorul extractelor leucocitare respective.

Pornind de la faptul că este posibil și la om transferul de sensibilitate față de grefa de piele cu ajutorul leucocitelor sau extractelor leucocitare de la donatorii sensibilizați în prealabil, se pot formula cîteva premise pentru un mecanism de eliminare a grefei: a) eficiența leucocitelor, a extractelor leucocitare sau a diferitelor preparate de celule în transferul sensibilității de tip întîrziat, specifică eliminării homografelor, este o realitate care impune concluzia că acest efect este mediat de intervenția unui „factor de transfer"; b) extractul leucocitar este incapabil să transfere și capacitatea de formare a anticorpilor serici, atît la bolnavii cu agammagloubulinemie (233), cît și la oamenii normali (342); c) funcția transferată de extractele leucocitare la om este aceea de a declanșa alergia de tip întîrziat și de a o întreține în organismul receptorului timp de 2—3 săptămîni (întocmai ca persistența sensibilității induse la donator).

Inconvenientul testului lui Medawar (394), ca și al variantei propusă de Lawrence și Pappenheimer (342), constă în faptul că, între efectuarea (injectarea leucocitelor sau a extractelor leucocitare) și citirea lui (eliminarea accelerată a grefei de piele aplicată ulterior) este necesar un interval de timp destul de lung, de cîteva zile, perioadă în care animalul receptor se poate imuniza progresiv. De aceea, Warwick și colab. (626), au propus, pe baza unui model experimental ingenios, un alt test, care are avantajul că rezultatul poate fi obținut în 24 de ore de la practicarea lui. Acești autori au lucrat pe iepuri. Inducerea sensibilizării donatorului de leucocite și de grefă de piele, s-a făcut cu ajutorul unui amestec de streptokinază-streptodornază (SK-SD). Această stare s-a instalat la 5 zile după injectarea preparatului și a putut fi transferată cu ușurință prin celulele splenice sau limfoide ale animalului astfel sensibilizat, începînd cu 10 zile de la administrarea SK-SD. Iepurele donator de piele a fost și donator de leucocite pentru transferul sensibilității întîrziate la SK-SD, fiind injectat în prealabil cu acest preparat. În cazul acestui model experimental s-a urmărit realizarea unui transfer pasiv al sensibilității de tip

Scanned with OKEN Scanner

întîrziat (față de SK-SD) de la donator la receptor. Realizarea transferului pasiv se evidențiază la 24 de ore cu ajutorul unei intradermoreacții la SK-SD. Donatorul de leucocite sensibilizate la SK-SD a fost și donator de piele. Homografa de piele s-a aplicat la receptor înaintea transferului de leucocite sensibilizate și s-a urmărit efectul ei asupra transferului pasiv de sensibilitate la SK-SD. Astfel, intradermoreacția servește ca un test *in vivo*, care determină efectul homografei de piele prealabile asupra transferului pasiv ulterior de sensibilitate întîrziată (donatorul fiind același). Rezultatele acestor experiențe au arătat că, la 3—5 zile după ce a primit o grefă de piele, la receptor se dezvoltă capacitatea de a bloca transferul pasiv de sensibilitate întîrziată, intradermoreacția la SK-SD devenind negativă după acest scurt interval de timp. Blocarea acestui transfer este foarte intensă și durează 3—4 săptămîni, după care dispare, intradermoreacția devenind pozitivă pentru SK-SD. Acțiunea de blocare este specifică de individ și se exercită strict asupra celulelor albe ale donatorului de grefă de piele.

Metoda lui Warwick și colab. (626) poate fi folosită cu succes, ca test relativ simplu de investigație și cu o înaltă specificitate în urmărirea apariției imunității la homografă. În comparație cu alte metode, timpul de 24 de ore necesar pentru realizarea ei este foarte scurt. Inconvenientele sale constau în faptul că sensibilizarea donatorului la SK-SD durează 10 zile, iar cantitatea de leucocite necesară realizării unui transfer pozitiv este mare (2×10^8 leucocite).

Din moment ce transferul de sensibilitate față de homografa de piele s-a putut realiza cu leucocite sau extracte de leucocite sensibilizate în mod adecvat, a fost plauzibilă presupunerea că ea poate fi realizată și cu ajutorul agenților umorali. Un rezultat pozitiv în acest sens ar fi un argument important în favoarea rolului anticorpilor umorali în distrugerea grefei. O serie de autori (121, 122, 332, 580, 581) au încercat să obțină transferul imunității de transplantare la homografa de piele cu ajutorul agenților umorali, însă aceste rezultate s-au obținut de fiecare dată în anumite condiții experimentale și cu anumite combinații de animale, ceea ce a făcut ca interpretarea rezultatelor să fie discutabilă și, deci, să nu se poată trage concluzii generale. Pentru a ilustra, pe scurt, acest aspect al problemei, este suficient să fie prezentate observațiile lui Steinmüller (574). Acest autor a reușit, cu ajutorul izoantiserului imun, să transfere pasiv rezistența la homografe de piele între două specii de șobolani foarte diferite genetic (liniile genetice BN și Lewis). Gazda a fost un șobolan BN. Serul imun s-a recoltat de la un șobolan BN (gazdă primară), grefat cu piele de la un șobolan Lewis. Serul a avut o activitate puternică anti-Lewis la 6 zile de la aplicarea grefei de piele receptorului, activitatea maximă a fost atinsă la 10 zile și a scăzut considerabil după 20 de zile. Injectarea de 1 ml ser imun unui al doilea șobolan BN (gazdă secundară), căruia i s-a aplicat o homografă de piele de la un șobolan Lewis cu 2 zile înainte, a dus la distrugerea rapidă și completă a grefei de piele. Această eliminare depinde de timpul scurs între grefarea pielii și administrarea serului, are intensitatea maximă în intervalul de 2—4 zile și este fără efect după 6 zile. Activitatea hemaglutinantă și citotoxică a serului, determinată *in vitro*, nu a influențat realizarea transferului de imunitate și deci nu poate fi incriminată în acest proces. Succesul acestui transfer a fost însă legat de folosirea

Scanned with OKEN Scanner

combinației de animale receptor BN — donator Lewis; transferul nu s-a mai putut realiza în alte combinații și nici măcar în combinația inversă, receptor Lewis — donator BN.

Celulele limfoide, incubate cu un antigen și transferate apoi unui alt animal, sînt capabile să provoace răspunsul imunologic al acestuia față de antigenul respectiv. Dacă, înainte de a fi injectate aceste celule limfoide, receptorului i se administrează leucocite de la același donator, celulele limfoide transferate ulterior sînt eliminate și nu mai provoacă răspunsul imunologic menționat (269). S-a realizat prin urmare inducerea activă a unui efect supresor asupra limfocitelor respective. La iepuri se poate obține efectul supresor și asupra celulelor din ganglionii limfatici, care drenează zona unde s-au injectat leucocitele donatorului (imunitate prin „adopțiune"). Același efect supresor s-a realizat, pasiv, prin administrare de ser antileucocitar de iepure (270). Efectul unui asemenea ser de a provoca eliminarea celulelor limfoide transferate poate fi demonstrat fie prin injectarea sa la viitorul receptor de limfocite, fie prin incubarea limfocitelor ganglionare cu ser înainte de transfer (270, 271). Celula limfoidă incubată cu acest ser este capabilă de a absorbi substanța responsabilă de efectul supresor (anticorpul respectiv din ser), care acționează ca anticorp față de antigenele de transplantare ale iepurelui donator de limfocite. Factorul limfocitar, care reacționează cu acest anticorp supresor din serul antileucocitelor de iepure, s-a dovedit a fi localizat în fragmente obținute din limfocite ganglionare de iepure, separate cu ajutorul oscilațiilor ultrasonice și al centrifugării diferențiate. El se obține și din celule splenice și hepatice. Injectarea sa la iepure dă naștere la anticorpi supresori, care se regăsesc în ser și care, administrați unui alt animal, duce la eliminarea celulelor limfatice transferate ulterior de la donatorul de la care s-a recoltat serul cu anticorpi. Anticorpul supresor pare a fi o pseudoglobulină și poate fi absorbit și eluat de pe diverse coloane de celuloză (273).

5. ROLUL ANTICORPILOR UMORALI ÎN REACȚIA IMUNOLOGICĂ DE TRANSPLANTARE

Demonstrarea prezenței anticorpilor umorali în cursul reacției imunologice din transplantare a deschis problema fundamentală a rolului lor în distrugerea țesutului homotransplantat și, mai ales, a eventualei acțiuni selective, condiționată de tipul de transplant.

S-a reușit transferul reacției de grefă albă cu ajutorul serului imun (541). Însă, pe de altă parte, în cazul homografelor bine tolerate un timp îndelungat (toleranță care poate fi abrogată prin transferul unor celule imunologic active de la donator), transferul pasiv de ser nu are nici un efect (85, 578). Algire și colab. (7) au arătat că acțiunea anticorpilor serici pare a fi mai puternică asupra unui sistem heterolog de grefe. Pornind de la acest fapt, Hasková și colab. (278) au folosit ca model experimental un sistem de grefe heterologe, în scopul de a stabili dacă este posibil să fie abolită, cu ajutorul unui antiser sau al concentratelor de γ-globuline, toleranța realizată între două animale pentru grefe de piele și să se obțină astfel eliminarea grefelor bine tolerate pînă la administrarea acestor preparate. Între rața domestică (*Anas platyrhinchs*) și

Scanned with OKEN Scanner

rața Muscovy (*Cairina moscheta*), aparținînd la două specii diferite, se poate obține o bună toleranță a grefelor de piele aplicate de la una la cealaltă. Administrînd o cantitate suficientă de anticorpi serici receptorului tolerant la grefă, Hašek (276) a obținut abolirea imediată a toleranței și distrugerea grefei tolerate de piele. Serurile imune s-au obținut prin imunizarea mutuală a rațelor din ambele specii (prin heterotransplantare de piele și administrarea unor doze repetate de sînge și omogenate tisulare în adjuvant Freund). Pentru abolirea toleranței au fost necesare doze mari de ser și anticorpi (10—22% din greutatea corpului gazdei). Distrugerea heterografei tolerate s-a efectuat rapid după administrarea serului: la 2 ore, grefa a devenit hemoragică, după 2 zile a devenit neagră și uscată, iar după cîteva zile s-a eliminat complet.

Prin înghețare sau încălzire la 56°, timp de 30 de minute, efectul distructiv al imunoserului nu se modifică. Sînt eficace și serurile adsorbite în prealabil pentru aglutinine cu hematiile speciei opuse, ceea ce dovedește că hemaglutininele nu intervin în această reacție. Astfel se explică de ce toleranța la eritrocite poate fi separată de toleranța la homografă (277, 566). Adsorbirea precipitinelor din ser cu ajutorul serului speciei opuse determină modificarea tabloului de eliminare (nu apar edeme și hemoragie precoce), dar nu o întîrzie. Aceste rezultate demonstrează că reacția indusă de serul imun este o combinație a unei reacții de necroză vasculară, datorită heteroprecipitinelor și a unei acțiuni directe a anticorpilor citotoxici, despre care se știe că sînt prezenți în sistemele heterologe (261, 357, 426).

Prepararea fracțiunii γ-globulinice din serul imun și administrarea ei intraperitoneală duce la aceleași efecte.

Încercările de a obține distrugerea toleranței pentru grefe de piele într-un sistem omolog (șoarece) s-au soldat însă cu eșec. Imediat după administrarea anticorpilor, o mare parte din animale mor cu necroză splenică și hemoragii pulmonare, iar animalele care supraviețuiesc conservă în continuare, grefa, intactă.

S-a menționat anterior că, la șoareci, răspunsul imun față de homografa de piele se poate evidenția fie prin eliminarea accelerată a grefei secundare, fie prin titrarea hemaglutininelor serice care apar în cursul eliminării. Micklem și Brown (408) au încercat să folosească cele două teste comparativ, pentru a lămuri relațiile dintre eliminarea grefei, pe de o parte, și formarea și acțiunea hemaglutininelor pe de altă parte. Acești autori au aplicat cele două teste la două loturi de șoareci, cărora li s-au efectuat homografe de piele, primul lot nefiind supus vreunui tratament, în timp ce al doilea lot a fost iradiat cu diferite doze de raze Röntgen (200, 400 și 750 r). Rezultatele acestor experiențe sînt foarte interesante. În primul rînd trebuie arătat că deși după grefarea pielii apar în general hemaglutinine serice la receptor, în unele cazuri, eliminarea grefei are loc totuși fără să se formeze hemaglutinine în cantitate detectabilă. Invers, în alte cazuri, titruri mari de hemaglutinine nu se însoțesc de scurtarea duratei medii de supraviețuire a grefei. Deci, durata medie de supraviețuire a grefei nu pare a fi afectată de titrul hemaglutininelor serice, acești anticorpi fiind insuficienți pentru realizarea unei eliminări complete. În al doilea rînd, trebuie subliniat că eliminarea grefei primare de piele se face cu participarea celulelor sensibilizate ale receptorului, avînd aspectul unei reacții de sensibilizare de tip întîrziat, în care participarea anticorpilor serici nu pare

Scanned with OKEN Scanner

a fi esențială. La șoareci nesensibilizați în prealabil, eliminarea grefei de piele se face chiar fără apariția unor titruri detectabile de hemaglutinine. În al treilea rînd trebuie menționat că iradierea cu 400 r s-a dovedit suficientă pentru a inhiba producerea de hemaglutinine serice la șoareci nesensibilizați în prealabil cu antigene diverse, în timp ce această doză are numai un efect de întîrziere cu 1—2 zile, asupra eliminării a două grefe succesive de piele. Există, deci, diferențe de radiosensibilitate de la o fază la alta a răspunsului imun, ceea ce poate constitui un argument important în favoarea lipsei de cauzalitate directă între apariția hemaglutininelor și eliminare. Faptul că iradierea suprimă mai ușor formarea hemaglutininelor decît eliminarea grefei poate fi interpretat ca o blocare selectivă a dezvoltării plasmocitelor și, implicit, ca o lipsă de participare directă a acestor celule la procesul de eliminare.

În stabilirea rolului eventual al anticorpilor umorali în eliminarea homografelor, poate că etapa cea mai greu de depășit este găsirea unui model experimental adecvat. Au fost menționate cele două modele experimentale, folosite de Hašek (276) și Micklem și colab. (408), care nu au permis decît emiterea unor ipoteze, fără a furniza argumente experimentale precise *pro* sau *contra* în această problemă. Un alt model experimental, conceput în același scop, este acela utilizat de Zaleski și colab. (648). Acești autori au urmărit apariția eliminării de tip accelerat a inimii homotransplantate, după ce receptorul a fost sensibilizat prin administrarea unor fracțiuni subcelulare din splina donatorului. Astfel, ei au constatat că singura fracțiune subcelulară care provoacă eliminarea accelerată a homotransplantului de inimă este fracțiunea nucleară a splenocitelor, mitocondriile și microzomii lor neavînd vreun efect. Rolul anticorpilor umorali, apăruți la receptor după sensibilizare, a fost evaluat de către acești autori (648) prin efectul lor asupra creșterii permeabilității vaselor sanguine ale homotransplantului de inimă în curs de eliminare. La animalele sensibilizate s-a observat creșterea permeabilității vasculare a inimii transplantate începînd de la o oră după efectuarea transplantului. Perfuzia inimii *in vitro* cu sîngele donatorului amestecat cu plasma receptorului, sensibilizat în prealabil prin administrarea unui omogenat splenic de la donator, a dat aceleași rezultate. Timpul de supraviețuire a inimii transplantate s-a dovedit a fi în strînsă corelație cu concentrația γ-globulinelor din plasmă. Scăderea nivelului acestei fracțiuni de proteine plasmatice prin folosirea antimetaboliților a mărit timpul de supraviețuire a homografei cardiace, dar eliminarea ei prin transfuzie nu a mărit toleranța. Datele obținute de Zalesky și colab. (648) pot fi considerate ca argumente în favoarea rolului anticorpilor serici în eliminarea grefei, dar, la fel ca datele altor cercetători, prezentate mai înainte, ele nu sînt foarte concludente.

Terasaki și colab. [citat de (397)] au preparat un antiser de șoarece (de linie genetică A) față de celulele renale ale unui alt șoarece (de linie genetică CA) și l-au injectat în artera renală a șoarecelui donator de celule renale. S-a obținut prin acest procedeu o alterare a funcției renale a acestuia cu creșterea ureei sanguine, apariția proteinuriei și modificarea clearanceului de ^{131}I-hipuran. Alterarea funcțiilor renale a avut loc la 43% din animalele perfuzate cu ser imun, față de 19% din animalele injectate cu ser normal. Diferența de 24%, care se realizează în favoarea serului imun, este, fără îndoială, semnificativă și poate fi considerată ca argument în favoarea rolului anticorpi-

Scanned with OKEN Scanner

lor umorali în imunizarea de transplantare, fără a fi însă întru totul concludentă.

În ciuda acestei evidențe considerabile de date experimentale, din care au fost citate mai sus cele mai semnificative, problema rolului anticorpilor umorali în mecanismul de eliminare a homografelor, rămîne deschisă, în acest domeniu neputîndu-se face în prezent generalizări valabile și concludente. Dacă anticorpii umorali au un rol în procesul de eliminare, acest rol pare a fi în orice caz secundar.

6. ROLUL ANTICORPILOR TISULARI ÎN REACȚIA IMUNOLOGICĂ DE TRANSPLANTARE

Consecința logică a concluziei, potrivit căreia anticorpii umorali au un rol secundar în reacția imunologică de transplantare, este acceptarea faptului că rolul principal în această reacție revine celuilalt tip de anticorpi, anticorpii tisulari (sau mai corect spus, anticorpii celulari). Anticorpii legați de celulă, generați de antigenele din țesuturile transplantate, au fost evidențiați pentru prima dată la iepuri cu homografe de piele (183). Ulterior s-a observat că oile cu agammaglobulinemie (deci cu imposibilitate de a elabora anticorpi serici) elimină viguros homografele de piele (517).

Grefele de tumori persistă și nu sînt eliminate dacă au fost incluse intraperitoneal în camere milipore, care permit accesul anticorpilor serici în interior, dar nu și accesul celulelor gazdei (586, 639). Astfel de grefe sînt distruse numai cînd dimensiunea porilor este mare și permite trecerea celulelor gazdei prin ei (627). În cazul grefelor tumorale, prezența unui titru înalt de anticorpi serici este adesea asociată cu o reducere a reacției grefei, fenomen cunoscut sub numele de potențare sau facilitare (*enhancement*, în literatura engleză).

Brondz (94) a urmărit *in vivo* și în culturi de țesuturi, interacțiunea dintre anticorpii umorali și celulele limfatice ganglionare imune. În trei sisteme de tumori-gazdă, celulele limfatice ganglionare, imunizate față de gazdă, au suprimat efectul de potențare al antiserurilor asupra tumorilor incompatibile, în timp ce administrarea antiserurilor respective (conținînd anticorpi umorali) nu a prevenit efectul citotoxic al celulelor limfatice imunizate.

Relația persistă chiar dacă se administrează cantități în exces de ser și doze minime active de limfocite imune. În culturile de țesuturi, absorbția limfocitelor pe macrofage alogene sau celule tumorale permite exercitarea efectului lor citotoxic, care nu poate fi inhibat prin tratarea prealabilă a respectivelor celule cu antiserurile corespunzătoare. Anticorpii umorali absorbiți *in vivo* sau în culturi de celule omologe nu previn absorbția limfocitelor imunizate pe aceste celule și nici efectul citotoxic consecutiv acestei absorbții.

Analizînd rezultatele experiențelor de transfer pasiv al imunității de transplantare cu ajutorul serurilor imune, Medawar și Peer (400) au ajuns la concluzia că un transfer pasiv adevărat al acestei imunități nu se poate realiza prin această metodă, iar Mitchinson și Dube (425) au relatat că momentele în care imunitatea de transplantare și titrul anticorpilor serici se află la intensitatea și, respectiv, valorile maxime, nu coincid.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru rolul important al anticorpilor tisulari în eliminarea grefei, pledează numeroase lucrări experimentale, iar dintre acestea sînt prezentate în continuare cîteva din cele mai semnificative.

Un model experimental deosebit de ingenios este prezentat de Silverstein şi colab. (538), pe baza capacităţii mielului fetal (în uterul oii) de a elimina grefa de piele în mod specific (517). În această condiţie unică, fătul este deficitar sau complet lipsit de imunoglobine (541). Deficitul rezultă din producerea limitată a acestor proteine de către făt şi din faptul că, la oaie, anticorpii nu pot trece prin placentă. Feţilor de oaie li s-au aplicat intrauterin grefe ortotopice de piele la 120—139 de zile de gestaţie, fără întreruperea sarcinii. După 7, 10 şi 14 zile de la grefare, ei au fost extraşi prin operaţie cezariană iar sîngele ombilical a fost investigat serologic. Toate grefele de piele (10 experienţe) s-au aflat în momentul extragerii din uter în plin proces de eliminare. În nici unul din cazuri nu s-au găsit plasmocite mature sau imature infiltrate în grefă sau în patul ei şi nici în ganglionul limfatic satelit grefei. Serul animalelor cercetate nu a avut modificări detectabile electroforetic comparativ cu serurile normale de feţi de oaie, în sensul că β_{2M}-globulinele au fost crescute, iar 7S γ-globulinele şi β_{2A}-globulinele au fost practic absente (540). Fătul de oaie este totuşi capabil să formeze anticorpi serici, faţă de unele antigene (541) şi, deci, lipsa lui de răspuns prin anticorpi serici, în cazul unei grefe sterile de piele, nu este condiţionată de capacitatea sa proteinoformatoare, ci este o reacţie specifică, condiţionată de grefă. Experienţele de control au demonstrat că prezenţa în circulaţia fetală a 7S γ-globulinelor antioaie şi a anti β_{2A}-globulinelor nu inhibează mersul normal al eliminării homografei. Aşadar, grefa ortotopică de piele aplicată la fătul de oaie se elimină în mod normal fără prezenţa imunoglobulinelor şi a plasmocitelor şi chiar în prezenţa globulinelor antioaie circulante. Fătul de oaie este capabil să elimine grefa ortotopică de piele cu multă competenţă în tot timpul gestaţiei (537, 539).

În ce măsură însă mecanismul eliminării grefei, în acest exemplu, poate fi generalizat la grefele de ţesuturi solide, este o problemă în care datele experimentale amintite permit să facem numai ipoteze. Numeroase alte fapte experimentale au întărit de-a lungul anilor ipoteza că eliminarea grefelor de ţesuturi se face pe baza unui mecanism de hipersensibilizare de tip întîrziat, în care rolul principal revine celulelor. Această concepţie a fost susţinută cu multă fermitate de Lawrence (338, 340) şi la ea au subscris ulterior majoritatea cercetătorilor, ca urmare a numeroase argumente experimentale care pledează pentru această interpretare.

Astfel, celulele limfoide ale animalului-gazdă, sensibilizate prin transplantarea unei homografe, rămîn imunologic active dacă sînt transplantate la un animal indiferent (636). La om s-a dovedit eficace şi extractul de celule leucocitare (343), după cum s-a arătat mai înainte. Brent şi colab. (84) au arătat că reacţia cobaiului, care are o homografă de piele este o reacţie asemănătoare reacţiei la tuberculină. Injectarea intradermică a celulelor limfoide ale acestui cobai sensibilizat la donatorul de grefă dă naştere unui fenomen tipic, numit de autori (84) „reacţie de transfer". Distrugerea ultrasonică a celulelor limfoide de la şoarece (din linia genetică BA), sensibilizate faţă de altă linie genetică (A), permite evidenţierea în supernatant a unui agent capabil de a distruge o grefă

Scanned with OKEN Scanner

de piele după 6 zile de la administrarea lui (441). În supernatant s-au identificat albumine, - sau β-globuline similare imunologic cu proteinele corespunzătoare din serul şoarecelui. După absorbţia supernatantului cu antiser γ-globulinic antişoarece, efectul său asupra grefelor de piele a dispărut în 9 cazuri din 10. Factorul respectiv nu a putut fi însă identificat cu precizie (195).

Asimilarea mecanismului de hipersensibilizare de tip întîrziat în mecanismul de eliminare a homografelor este, practic, un fapt stabilit. Ceea ce nu a fost încă stabilit este dacă acest mecanism este unic în procesul de eliminare. În majoritate, observaţiile experimentale sînt împotriva admiterii acestuia ca unicul mecanism al eliminării. Faptul că nu s-a putut demonstra prezenţa constantă a anticorpilor serici în cursul eliminării homografelor nu înseamnă neapărat că anticorpii celulari sînt singurii anticorpi care intervin în această reacţie; nu este exclus ca lipsa anticorpilor serici să fie nereală, ca urmare a faptului că metodele folosite pentru depistarea lor nu sînt suficient de sensibile. Good şi Zak (234) au obţinut, de exemplu, supravieţuirea îndelungată a homografelor de piele la subiecţi umani cu agammaglobulinemie, care, după părerea acestor autori, au reacţionat prin mecanismul hipersensibilizării de tip întîrziat (475), dar rezultatele lor nu au fost confirmate de Schubert şi colab. (520). Homografele plasate în camere milipore supravieţuiesc timp îndelungat, pentru că, în primul rînd, sînt protejate de accesul celulelor gazdei. Însă ele sînt protejate indirect şi de accesul citotoxinelor gazdei, deoarece pentru a fi eficace, citotoxinele reclamă prezenţa complementului, iar Amos (15) a arătat că acesta pătrunde foarte greu în camerele milipore. De altfel, chiar transferul de sensibilitate, realizat prin transferul celulelor limfoide de la o gazdă sensibilizată printr-o homografă la un animal indemn, nu demonstrează rolul exclusiv al anticorpilor tisulari legaţi direct de celulă, deoarece limfocitele sînt interesate direct în sinteza şi transportul anticorpilor serici.

Aşadar se poate afirma că este posibil ca reacţia normală a organismului faţă de homografe să nu se realizeze printr-un singur mecanism.

Gorer (241) şi Batchelor şi colab. (41) au demonstrat că tipul dominant de reacţie depinde de tipul de grefă şi că interacţiunea dintre anticorpii sesili şi cei umorali poate avea fie caracterul unei reacţii sinergice, fie caracterul unei reacţii antagonice, în funcţie de condiţiile existente. Astfel, în cazul eliminării primare a homografelor de piele şi a tumorilor, reacţia celulară este foarte puternică şi, implicit, mecanismul dominant al eliminării este de tipul hipersensibilizării de tip întîrziat (85, 100, 340). În acest caz, sensibilitatea reacţiei celulare şi răspunsul producerii de anticorpi la acţiunea razelor Röntgen sînt diferite, ca urmare a existenţei a două mecanisme imunologice diferite (408, 536). Pappenheimer şi colab. (475) au presupus că hipersensibilitatea de tip întîrziat ar reprezenta numai un stadiu în procesul de sinteză a anticorpilor, dar ipoteza lor nu este confirmată de date experimentale suficient de convingătoare pentru domeniul reacţiilor faţă de homografe. Brent şi Courtenay (87) consideră că grefa de piele constituie un caz special şi este susceptibilă de a se modifica la un răspuns imun slab, datorită faptului că, prin alterarea sistemului său vascular în cursul răspunsului imun, se distruge un număr de celule, ceea ce potenţează procesul de eliminare a celorlalte celule; alterarea unui număr de celule independent transplantate (de exemplu, splenocite) nu prejudiciază supravieţuirii celorlalte celule rămase. Astfel, la şoarecii cu himerism celular

Scanned with OKEN Scanner

(celule de măduvă hematogenă), grefați cu piele, recuperarea parțială a funcțiilor lor imune după tratament cu raze Röntgen duce la eliminarea grefei de piele (realizată pe baza unui răspuns imunologic slab) și nu afectează proliferarea celulelor de măduvă osoasă în splina receptorului, aceste celule reușind deci să depășească bariera imunologică slab recuperată de animale.

În cazul heterografelor de piele de la șobolan la șoarece, concomitente cu crearea himerismului celular de măduvă hematogenă, peste 50% din animale elimină grefele de piele, dar nu și celulele de măduvă hematogenă de șobolan după iradiere cu raze Röntgen. Șoarecii care elimină grefa de piele nu au hemaglutinine serice detectabile, pe cînd cei care și-au recuperat complet capacitatea imunologică și au eliminat atît grefa de piele, cît și celulele medulare, au un titru crescut de anticorpi serici (536).

Este greu de susținut astăzi opinia extremistă, care atribuie eliminarea grefelor unui singur mecanism. În anumite condiții, unul din factorii particulari deține un rol predominant, dar gradul de influență exercitat de acest factor se poate modifica o dată cu schimbarea condițiilor respective. Billingham și Sparrow (76) au arătat că dezvoltarea în mediu de cultură a celulelor epidermice de iepure, disociate, poate fi inhibată de prezența serurilor imune, în timp ce dezvoltarea acelorași celule, nedisociate însă, nu este influențată. La șoareci, influența factorilor celulari în eliminarea grefelor devine mai puțin importantă, pe măsură ce gazda este supusă în continuare imunizării. Infiltrația celulară caracteristică unei grefe primare este mult mai șterșă la grefa secundară, iar hiperimunizarea duce la tipul de eliminare de grefă albă, considerată de unii ca un fenomoen Arthus (124). Rolul anticorpilor umorali rămîne, deci, nesigur în cursul eliminării grefei primare, dar ei capătă o importanță deosebită la gazda imunizată. După cum s-a menționat, factorii celulari și cei umorali ar putea acționa independent, cu efect adițional, sinergic sau chiar antagonic.

Urmărind interrelațiile celulelor imune și serurilor pe grefe de celule sarcomatoase ascitogene BP8, Batchelor și colab. (41) au pus în evidență o inhibiție marcată a creșterii tumorale la animalele tratate cu doze subefective de celule sensibilizate în asociere cu seruri imune, ca și cum celulele și serul ar fi acționat sinergic. Modificînd modelul experimental inițial, Batchelor și Silverman (42) au obținut inhibiția creșterii intraperitoneale a celulelor sarcomatoase ascitogene BP8 la receptori neimunizați, prin amestecarea inoculului tumoral cu celule limfoide derivate de la șoareci izogeni, sensibilizați în prealabil față de tumoarea BP8. Ei au demonstrat existența unei interferențe între prezența izoanticorpilor antitumoare BP8 la animalul-gazdă și efectul protector al celulelor imune. Imunizarea pasivă a unor gazde de linie genetică Balb/c și a unor hibrizi Balb/c×C57BL. inoculați cu celule tumorale BP8 nu inhibează dezvoltarea unei reacții celulare la gazdă; însă, deși în gazdă sînt prezente celule reactive, eliminarea grefei tumorale nu este completă. În acest caz, aceste celule reactive funcționează cu efect scăzut în prezența unui exces de anticorpi umorali. Excesul anticorpilor umorali poate avea, deci, un efect dublu: pe de o parte să scadă eficacitatea celulelor hipersensibilizate, iar pe de altă parte să inhibeze sensibilizarea altor celule limfoide.

În ultimă analiză, orice răspuns imun al organismului față de țesuturile transplantate este, în fond, celular, în sensul că toți anticorpii sînt formați,

Scanned with OKEN Scanner

eliberaţi şi transportaţi de către celule imune. Natura celulară a reacţiei imune este cu atît mai evidentă, cu cît anticorpii nu numai că derivă din celule, dar locul lor de acţiune este însăşi celula şi antigenul este tot de natură celulară. Atît calea aferentă, cît şi cea eferentă, în cazul reacţiei la grefă, sînt procese de la celulă la celulă.

Pentru a pătrunde în ser, anticorpii trebuie să treacă prin bariera membranei celulare sau să se desprindă de ea şi, în consecinţă, trebuie să existe un gradient între concentraţia anticorpilor din sau de pe celulă şi mediul înconjurător. Această concentraţie, probabil mai mare, în imediata vecinătate a celulelor imune, ar explica efectul lor local şi dificultatea detectării lor în ser (183).

Se poate admite şi ipoteza că unii anticorpi sînt eficace numai cînd sînt legaţi de celulă. Complexul antigen-anticorp, o dată format, alterează fără îndoială atît suprafaţa celulelor imune, cît şi a celulelor grefei, complementul avînd şi el un oarecare rol în acest proces (19). Această alterare a celulelor permite eliberarea enzimelor proteolitice, care produc liza celulelor grefei, proces distructiv asociat cu fagocitoza (403, 627).

7. MECANISMUL DE ACŢIUNE A ANTICORPILOR ÎN CURSUL REACŢIEI IMUNOLOGICE DE TRANSPLANTARE

După Eichwald (182), succesiunea reacţiilor la nivelul centrilor imuni (ganglioni limfatici, ţesut limfoid, splină etc.) în cursul eliminării homografelor ar fi următoarea: a) antigenul din ţesuturile grefei, după oarecare transformare datorită intervenţiei fagocitelor histioide (207), intră în contact cu limfocitele mici ale gazdei; b) ca urmare a acestei interacţiuni, limfocitele mici se transformă în celule mari pironinofile, producătoare de anticorpi; celulele mari, pironinofile, proliferează intens şi se acumulează la periferia centrilor germinativi ai ganglionilor limfatici şi splinei (20, 257, 529, 531); c) ulterior, ele se disemineză în organism şi tind să se acumuleze în ţesutul homotransplantat (în cazul grefei de piele, de exemplu, în patul dermic al grefei).

S-a putut demonstra că transformarea pironinofilă a limfocitelor mici este reversibilă şi că celulele pironinofile se pot retransforma în limfocite mici. Gowans şi colab. (257) au arătat că, în general, celulele limfatice care se acumulează în patul grefei sînt celule tinere, formate în organism după apariţia stimulului antigenic, spre deosebire de celulele limfatice aflate în ganglioni şi în sîngele periferic în momentul eliminării, care sînt celule adulte.

Proliferarea limfatică din cursul reacţiei la grefă duce la mărirea splinei şi a ganglionilor limfatici, în special a celor din imediata vecinătate a grefei. Această proliferare se asemeană cu aceea din orice proces de imunizare obişnuită şi nu este legată specific de transplantare.

În privinţa mecanismului de acţiune *in vivo* şi *in vitro* a anticorpilor implicaţi în reacţia imună de transplantare s-au făcut numeroase studii, dintre care trebuie menţionate, în primul rînd, acelea ale lui Möller şi Möller (427, 429) asupra tumorilor şi ale lui Nelson (452—454) asupra transplantelor de celule şi ţesuturi. Möller şi Möller (429) au urmărit efectele citotoxic şi de potenţare ale izoanticorpilor umorali în tumorile transplantate la şoareci. Pe

Scanned with OKEN Scanner

loturi mari de animale şi cu mai multe variante de lucru, ei au stabilit că sensibilitatea citotoxică este în raport direct cu concentraţia izoantigenului H-2 la suprafaţa celulelor grefei (în special ale tumorii). Prin tehnici fluorescente, Möller (427) a arătat că anticorpii anti-H-2 se combină cu izoantigenele de suprafaţă ale celulelor vii tumorale. Se ştie de la studiul morfologic şi biochimic al anticorpilor heterologi că reacţiile dintre anticorpi şi antigene la suprafaţa celulelor, care au loc în prezenţa complementului, produc un profund dezechilibru osmotic al celulei şi, consecutiv, moartea sa (260, 347). Acelaşi proces pare a avea loc şi în cazul cînd celule tumorale sensibilizate de şoarece sînt supuse acţiunii izoanticorpilor şi complementului (247), deoarece aceste celule îşi măresc foarte mult volumul. De altfel, se pot obţine efecte citotoxice chiar în cazul cînd anticorpii nu reacţionează cu componente celulare esenţiale, cum ar fi liza hematiilor, ca urmare a conflictului dintre anticorpi şi diferite antigene necelulare, absorbite pasiv pe suprafaţa lor (385). În general se admite că izoantiserul de şoarece singur nu este citotoxic *in vitro* decît în prezenţa complementului, ceea ce demonstrează că efectul citotoxic este expresia unei reacţii antigen-anticorp în imediata vecinătate a suprafeţei celulare care leagă complementul. Gradul activităţii citotoxice depinde direct de concentraţia locală a complementului. Nu se cunoaşte precis mecanismul prin care complementul îşi exercită funcţia sa distructivă. După teoria lui Mayer (387), aceea a acţiunii unice, zonele reactive ale membranelor celulare ar consta dintr-un complex format de complement, două molecule de anticorpi şi un receptor de antigen. Acest complex ar fi suficient pentru a liza celula.

Experienţele lui Möller şi Möller (427, 429) au arătat că este necesar să existe la suprafaţa celulei o concentraţie critică de antigen, pentru ca activitatea citotoxică a anticorpilor să se poată exercita. Prin urmare, concentraţia critică de antigen necesară reacţiei acestuia cu complementul nu se poate obţine dacă receptorii antigenici sînt aşezaţi prea departe unul de celălalt. După părerea acestor autori (427, 429), cel puţin patru molecule de anticorpi trebuie să reacţioneze cu cel puţin doi receptori antigenici, dispuşi întîmplător pe suprafaţa celulei pentru ca efectul citotoxic să se producă. Acest efect ar depinde, în această situaţie, de distanţa dintre cele două complexe antigen-anticorp; o distanţă mică ar duce la realizarea unei concentraţii ridicate de complement pe o anumită porţiune a suprafeţei celulare şi va fi capabilă de a iniţia efectul citotoxic, în timp ce o distanţă mare ar duce la o diluare a complementului, care ar deveni neeficace.

Acelaşi mecanism a fost sugerat şi de Weinrach şi Talmage (628), pentru a explica liza eritrocitelor de oaie de către antiserul de iepure.

Este greu de admis că pentru distrugerea celulei ar fi suficient un singur receptor antigenic. Möller şi Möller (427, 429) au completat datele privind acest mecanism, arătînd că şi concentraţia antigenului de pe suprafaţa celulei este critică. Pentru ca activitatea citotoxică să aibă loc, este necesar, deci, ca toţi factorii reacţiei (anticorpi, antigen, complement) să fie în cantitate suficientă. Diluarea serului sau a complementului duce la scăderea numărului de celule distruse.

Între celulele sensibile şi cele rezistente la acţiunea anticorpilor nu există diferenţe calitative; este suficientă o diferenţă cantitativă a concentraţiei receptorilor antigenici pe suprafeţele celulare, pentru a crea diferenţe în comportamentul imunologic. Pe de altă parte, concentraţia critică a complementului necesar reacţiei se poate realiza prin mai multe căi, iar cantităţile crescute de anticorpi leagă, proporţional, cantităţi mari de complement (427). Este posibil ca celulele active imunologic ale gazdei, care vin în contact cu celulele grefei, să fie capabile de a elibera anticorpi în concentraţie locală atît de ridicată, încît să se producă liza celulelor grefei, fie că aceşti anticorpi rămîn legaţi, fie că nu rămîn legaţi de celula producătoare.

În 1961, Nelson (452) a emis o altă ipoteză pentru explicarea mecanismului imunologic de transplantare. Ipoteza sa se bazează pe existenţa unei

Scanned with OKEN Scanner

structuri chimice similare, dar nu identice, între antigenele din țesuturile donatorilor și ale receptorilor. Un schimb de țesuturi între doi indivizi din aceeași specie ar duce la producerea de anticorpi cu specificitate față de antigenele donatorului, dar aceiași anticorpi ar putea reacționa și cu antigenele similare din țesuturile proprii ale receptorului. Astfel, mecanismul primar incriminat în reacția imunologică față de homografe ar fi compus din reacții imunologice încrucișate ale grupărilor funcționale ale moleculelor existente atît în țesuturile donatorului cît și în acelea ale receptorului. După producerea lor, anticorpii s-ar atașa la antigenele din țesuturile receptorului, indiferent dacă antigenele sînt localizate în celule fixe sau în celule mobile. Bineînțeles, se presupune că antigenele se află la suprafața celulelor sau sînt accesibile anticorpilor printr-o modalitate oarecare. În aceste condiții, anticorpii nu apar liberi în ser, fapt în concordanță cu observațiile respective din domeniul transplantării țesuturilor.

În urma invadării grefei de către celulele mobile, sensibilizate, ale receptorului, anticorpii s-ar disocia și s-ar transfera de la antigenele celulelor-gazdă (limfocite, polimorfonucleare, histocite etc.) la antigenele celulelor grefei, cu care reacționează încrucișat (celulele donatorului fiind responsabile direct de imunizare). Concepția antigenelor cu reacție încrucișată la indivizii din aceeași specie ar avea de asemenea echivalent în cazul indivizilor de specii diferite, purtători de antigene similare din punct de vedere chimic. Un asemenea antigen, prezent la mai multe specii, este antigenul Forssman. Alți cercetători (97, 645) au indicat existența unei reacții încrucișate, de natură imunochimică, între antigene izolate din hematii de oaie și rinichi de cal, rinichi de cobai și alte țesuturi ale animalelor din diferite specii.

Producerea anticorpilor cu reacție încrucișată a fost incriminată într-o serie de afecțiuni, care n-ar putea fi explicate altfel, decît ca efecte nocive ale combinațiilor dintre acești anticorpi și antigenele tisulare proprii, realizînd stări de autoagresiune, cunoscute sub numele de boli autoimune sau, mai plastic, „sinucidere imunologică".

În cazul țesuturilor transplantate, prima indicație a acțiunii anticorpilor cu reacție încrucișată asupra celulelor receptorului, după aplicarea unei homografe de piele, s-a obținut prin testul de imunoaderență (453, 461), a cărui sensibilitate este atît de mare, încît permite detectarea unei cantități de azot din anticorpi de 0,008μg/ml ser.

În testul de imunoaderență reacționează 30—40% din celulele ganglionilor limfatici și leucocitele, izolate de la cobai purtători de grefă (reacția avînd loc în prezența complementului de cobai), în timp ce procentul celulelor reactive de la animalele de control, cărora li s-au administrat antigene fără capacitatea de a induce o reacție încrucișată (autografe, heterografe, injecții cu virus vaccinal sau injecții cu polen), a fost de 3—8%. Deoarece Nelson (453) și Nishioka (461) au dovedit cu certitudine că reacția de adeziune pe hematiile umane are loc nu numai în prezența complementului, ci și a complexelor antigen-anticorp, rezultatele de mai sus se pot interpreta ca evidența faptului că celulele din ganglionii limfatici sau leucocitele receptorului homografei au fost sensibilizate *in vivo* prin anticorpi.

Pentru a demonstra participarea transferului anticorpilor în fenomenul de eliminare a homografei s-a adoptat ca model experimental, din considerente

Scanned with OKEN Scanner

tehnice, un sistem folosind complementul de cobai, eritrocite de oaie şi anticorpi hemolitici, preparaţi individual faţă de hematiile unor oi (adică seruri monovalente antihematii de oaie). Transferul anticorpilor de pe complexul format de anticorpi cu hematiile unei oi oarecare, pe hematiile oii faţă de care s-a preparat serul monovalent, se efectuează într-o proporţie şi un ritm considerabil crescute faţă de transferul anticorpilor din complexul respectiv, pe hematiile unei alte oi, oarecare, folosită în imunizare. Autorii consideră că rezultatele sînt semnificative în a demonstra că atît reacţia încrucişată dintre donatorul şi receptorul grefei, cît şi transferul anticorpilor de pe complexele formate de celulele receptorului şi anticorpi pe celulele grefei (adică ale donatorului), care au stimulat iniţial formarea acestor anticorpi, sînt mecanisme de bază în fenomenul de eliminare a homogrefei.

În 1963, Fuji şi Nelson (216, 454) au reinvestigat reactivitatea încrucişată a antigenelor de tip Forssman de la oaie, cal şi cobai, în vederea modelării reacţiilor anticorpilor implicaţi în homotransplantare şi, în unele cazuri, de heterotransplantare, în care donatorul şi receptorul posedă antigene similare din punct de vedere chimic. Tehnici de fixare a complementului, aglutinare şi inhibare a hemolizei au permis să se evidenţieze existenţa unei strînse legături imunochimice între antigenele de tip Forssman din celulele sau extractele celulare metanolice ale rinichilor, ganglionilor limfatici şi trombocitelor de cobai, rinichilor de cal şi eritrocitelor de oaie.

Disocierea din complexele anticorp-antigen menţionate a anticorpilor care reacţionează încrucişat şi reasocierea lor cu antigenele din eritrocitele de oaie, folosite pentru obţinerea anticorpilor, s-au pus în evidenţă prin dozări hemolitice cantitative. Această afinitate preferenţială a anticorpului faţă de antigenul folosit în imunizare poate fi considerată ca un model imunochimic al reacţiei care are loc în fenomenul de eliminare a grefelor în cazurile în care ţesuturile donatorului şi ale receptorului au antigene apropiate din punct de vedere chimic, care reacţionează încrucişat. Se poate presupune că acest tip de anticorpi, cu capacitate de reacţie încrucişată, include atît anticorpii cu tropism celular şi acţiune citolitică (82), cît şi factorul efector sau aşa-numitul „factor de transfer" (345), asociat la celulă. Asemănarea între factorul de transfer şi anticorpii de transplantare este dovedită de faptul că particulele subcelulare din celulele ganglionilor limfatici funcţionează ca nişte complexe anticorp-antigen cu reacţie încrucişată după tratament cu apă distilată şi de faptul că este posibil să se disocieze şi să se transfere anticorpii din aceste complexe cînd este prezent antigenul folosit iniţial în imunizare.

Importanţa teoretică a lucrărilor lui Nelson şi colab. (216, 452, 454) constă în faptul că ele au demonstrat că specificitatea de individ, care se întîlneşte în mod curent în homotransplantare, este relativă şi reprezintă o fază finală într-un sindrom de identitate parţială, manifestat prin reacţia încrucişată a antigenelor donatorului şi receptorului. În aceste circumstanţe este normal ca în ser să nu existe anticorpi sau, dacă există, să fie în cantitate foarte mică. De fapt, prezenţa anticorpilor serici la receptor ar servi ca o indicaţie majoră că ţesuturile donatorului posedă anumite antigene care nu sînt întru nimic asemănătoare cu ale receptorului. Faţă de observaţiile precedente este logic să se admită că anticorpii pot avea sau nu activitate citotoxică, în funcţie de localizarea antigenului în celula folosită pentru imunizare şi, eventual, de intensitatea

Scanned with OKEN Scanner

reacției încrucișate. De asemenea, pe baza acestor observații, rolul, bine cunoscut și important, al celulelor mobile mononucleare ale receptorului în eliminarea grefelor se poate încadra într-un mecanism imunochimic. În interpretarea strictă a datelor experimentale evidențiate de Nelson (452, 454), aceste celule nu sînt simpli transportori sau mediatori ai reacției imune, ci sînt complexe specifice imunologic, cu reacție încrucișată, care transferă și, probabil, concentrează anticorpii pe compușii antigenici ai celulelor donatorului.

8. ROLUL VÎRSTEI ÎN APARIȚIA IMUNITĂȚII DE TRANSPLANTARE

În privința apariției capacității imunologice de reacție în raport cu vîrsta animalului, situația este diferită de la o specie la alta. Astfel, la șoareci și șobolani, inducerea toleranței față de homografe se poate obține pe toată durata perioadei prenatale, la naștere și chiar cîtva timp după aceea. Deci, la aceste specii, competența imunologică apare cu vîrsta, animalele prezentîndu-se imature din punct de vedere imunologic în momentul nașterii (437). Aceste aspecte vor fi tratate detaliat în capitolul despre inducerea imunotoleranței biologice. O situație deosebită se întîlnește însă la alte specii, fapt pe care îl vom exemplifica prin cercetările făcute pe iepuri și păsări.

a) **Apariția imunității de transplantare la iepuri.** Această problemă a fost studiată de Najarian și Dixon (437), care au practicat grefe de piele la iepuri nou-născuți. Rezultatele acestor autori sînt rezumate în tabelul 23. Aceste

Tabelul 23

Eliminarea unor grefe diverse de piele la iepuri nou-născuți și iepuri adulți și efectul iradierii asupra acestui proces *

Donatorul	Receptorul	Fără iradiere		Iradiere totală (400 r)	
		Numărul de animale	TMS±DS*	Numărul de animale	TMS±DS*
Nou-născut (2—6 zile)	Nou-născut (2—6 zile)	35	6,6±1,3	20	9,6±1,3
Adult	Nou-născut (2—6 zile)	22	5,4±1,0	22	8,1±1,2
Nou-născut (10—14 zile)	Nou-născut (10—14 zile)	18	8,7±1,4	19	12,5±3,6
Adult	Nou-născut (10—14 zile)	14	8,2±1,5	15	11,9±2,8
Nou-născut (2—6 zile)	Adult	13	8,1±1,1	—	—
Adult	Adult	16	8,5±0,9	14	17,8±4,3

* TMS: timpul mediu de supraviețuire a grefei de piele. DS: derivația standard [după Najarian și Dixon (437)].

Scanned with OKEN Scanner

rezultate demonstrează că imunitatea în homotransplantele de piele la iepuri este la fel de bine dezvoltată la nou-născuți, ca și la adulți. Eliminarea grefei de piele între iepuri nou-născuți este mai rapidă decît în cazul transplantării pielii de la iepure nou-născut la iepure adult, ceea ce ar putea fi pus pe seama proliferării celulare intense din această perioadă.

Studii suplimentare, în perioada embrionară a iepurelui, au arătat că maturitatea imunologică la acest animal, apreciată pe baza posibilității de inducere a toleranței față de țesuturi omologe, nu se prelungește după a 22-a zi de gestație. Sterzl (575) a administrat la iepuri nou-născuți celule splenice de iepure adult și, separat, antigene bacteriene. El a demonstrat că, în primele 4 zile de la injectarea celulelor, antigenul bacterian evocă regulat formarea de anticorpi serici. Injectarea antigenului bacterian la 5 zile de la transferul celulelor splenice adulte dă rezultate nesigure, iar după 7 zile nu mai provoacă nici un fel de anticorpi. Faptul este interesant, deoarece se știe, că, la șoareci și șobolani, inducerea toleranței se poate obține pînă la naștere și chiar un timp după aceea, deci există o reacție diferită a animalelor, în funcție de specie.

b) **Apariția imunității de transplantare la păsări.** Pentru studiul *in vivo* al momentului apariției anticorpilor de transplantare la păsări, Trnka și Riha (598) au folosit ca receptori de grefe pui de găină în vîrstă de 48 de ore. Ca donatori de celule splenice normale s-au folosit găini albe adulte. După izolare, celulele splenice au fost sensibilizate cu antigene de *S. paratyphi B* și *Brucella suis*. Celulele sensibilizate cu antigen au fost injectate la puii de 48 de ore și la embrionul de pui, la care au indus formarea de anticorpi serici. După 15 zile de la transferul splenocitelor sensibilizate, 73% din pui au manifestat o reacție grefă-contra-gazdă și au murit (598). Se poate afirma, deci, cu certitudine, că în aceste cazuri transferul de celule splenice a fost pozitiv. La toți acești pui s-au detectat anticorpi serici. Celulele transplantate au stimulat formarea de anticorpi în titru mare, imaturitatea receptorului nefiind o piedică. Factorul limitativ în acest caz este reacția la homotransplant. Datorită reacției receptorului la celulele izolate, capacitatea formării de anticorpi este limitată în timp. Sterzl (575) a obținut aceleași rezultate. Dovezi asupra capacității imunologice a celulelor mezenchimale adulte, injectate la embrioni de pui sau pui foarte tineri a adus și Simonsen (545). El a injectat celule reticuloendoteliale de la găini adulte la embrioni de pui și pui foarte tineri și a detectat anticorpi serici prin testul Coombs, produși de celulele adulte transferate împotriva antigenelor donatorului.

D. ROLUL SISTEMULUI RETICULOENDOTELIAL ÎN REACȚIILE DE TRANSPLANTARE

Concepția asupra mecanismului de eliminare a homografelor oscilează între anticorpii serici convenționali, factorii imuni (mediați de celule) de tipul celor incriminați în alergia tuberculinică și o cale de mijloc, sugerată de Gorer (240), în care ambele mecanisme cooperează pentru ca receptorul să se poată elibera de țesuturile străine. Această lipsă de unanimitate demonstrează în primul rînd că problema mecanismului de eliminare nu este încă rezolvată (345). Pentru

Scanned with OKEN Scanner

a se putea discuta corect mecanismul eliminării unei homografe, Gorer (240) subliniază că este necesar să se specifice de la început tipul de homografă, dat fiind că nu există un mecanism unic, operant, în toate tipurile de homografe.

Eliminarea grefei este un proces imunologic și se efectuează în ultimă instanță ca urmare a unui conflict antigen-anticorp. Natura complexului antigen-anticorp poate varia în funcție de tipul de homografă, la unele predominînd procesul celular de sensibilizare de tip întîrziat, la altele rolul anticorpilor serici fiind mai evident. Asupra rolului și mecanismului de acțiune a anticorpilor în procesul de eliminare s-au prezentat amănunte în secțiunea precedentă a acestui capitol. În cele ce urmează se prezintă rolul limfocitelor, al timusului și al țesutului conjunctiv, elemente celulare cu o participare mai mult sau mai puțin importantă în procesul de eliminare, în funcție de tipul de homografă, dar, în orice caz, prezente în orice asemenea proces.

1. ROLUL LIMFOCITELOR ÎN PROCESUL DE ELIMINARE A HOMOGREFELOR

Reacția imună produsă de o homografă are o componentă aferentă, care constă pe de o parte din antigenele tisulare ale grefei, eliberarea din grefă și transferarea lor la gazdă, iar pe de altă parte din elementele pe seama cărora antigenele ajung la centrii de sensibilizare a organismului receptor.

În cazul homografelor de piele se admite astăzi în mod unanim că sensibilizarea receptorului este inițiată la nivelul ganglionilor limfatici regionali. Întreruperea temporară a căii limfatice prin ablația ganglionilor drenanți este urmată de întîrzierea eliminării grefei de piele atît la iepure, cît și la om. Această întîrziere demonstrează că dacă rolul ganglionului limfatic nu este hotărîtor, el este, în orice caz, de prim ordin în declanșarea eliminării grefei (59, 567). Circulația antigenelor de la grefă la ganglionii regionali ai gazdei se poate realiza atît pe cale sanguină, cît și pe cale limfatică. Prin secționarea trunchiurilor limfatice drenante ale grefei de piele, fără a leza ganglionii regionali și păstrînd conexiunile vasculare sanguine, Lambert și colab. (337) au obținut o întîrziere în eliminarea grefei de piele la urechea iepurelui, egală cu durata de timp necesară restabilirii căii limfatice. După restabilirea căilor limfatice are loc eliminarea standard a grefei. În cazul grefelor de piele, calea principală de transfer a antigenelor de la grefă la gazdă pare a fi cea limfatică. La animalele-martor, la care nu s-au secționat căile limfatice, modificările ganglionilor regionali devin nete începînd cu a 2-a zi de la grefare. Sistemul limfatic și limfocitele funcționează ca barieră în calea agenților antigenici ai grefei. Acest rol este evident, în special în cazul grefelor solide de țesuturi și organe.

Limfocitele au, de asemenea, un rol esențial în transferul pasiv al imunității de transplantare. Într-adevăr limfocitele unui animal sensibilizat prin aplicarea unei homografe de piele de la un donator X, au proprietatea de a transfera sensibilitatea față de donatorul X unui alt animal, indiferent dacă sînt injectate acestuia din urmă în cantitate suficientă și pe o cale adecvată. Acesta este fenomenul cunoscut sub numele de transfer al imunității dobîndite prin adopțiune.

Mai puțin lămurită este însă funcția limfocitelor în distrugerea directă a homografelor.

Scanned with OKEN Scanner

Primii cercetători care au evidenţiat rolul celulelor limfatice şi al plasmocitelor în reacţia celulară imună faţă de homografa de piele au fost Medawar (393), Billingham şi colab. (59) şi Weaver şi colab. (627). Gowans şi colab. (253) au arătat, în experienţe pe şobolani, că limfocitele mici sînt capabile să iniţieze o reacţie imunologică şi să se transforme în celule pironinofile. Un studiu interesant asupra distribuirii şi tipurilor de celule incriminate în eliminarea unei homografe a fost publicat de Najarian şi Feldman (440), care au folosit ca model experimental transferul pasiv al imunităţii de transplantare cu ajutorul limfocitelor sensibilizate şi marcate cu 3H-timidină. În cazul transferului pasiv al imunităţii de transplantare, aceşti autori au regăsit 33% din celulele marcate, totuşi, numărul celulelor marcate de la nivelul homografei a fost foarte mic. Celulele sensibilizate nu par a participa în mod electiv, direct, la distrugerea grefei, eliminarea ei efectuîndu-se probabil prin alt mecanism. Ulterior, aceeaşi autori (439, 440) au urmărit eficacitatea celulelor limfoide sensibilizate, introduse în camere milipore implantate în abdomenul animalelor de experienţă. Aceste camere au pori pe care nu-i pot traversa celulele, ci numai anticorpii. Pe linii genetice diferite de şoareci au fost urmărite, în ansamblu, atît efectul celulelor izologe sensibilizate, cît şi al celulelor omologe, sensibilizate şi transferate în interiorul camerelor milipore. Rezultatele au arătat că, în aceste condiţii experimentale, celulele sensibilizate sînt capabile să transfere imunitatea de transplantare atît la şoareci izologi, cît şi omologi, nesensibilizaţi în prealabil faţă de donatorul de grefă. Acest transfer nu s-a putut efectua direct, prin participarea celulelor, dat fiind că aceste camere, în care ele au fost incluse, nu permit trecerea celulelor din cameră în organismul animalului. Corelînd faptul că la locul eliminării, nu se întîlnesc decît foarte rare celule limfoide sensibilizate transferate (celulele marcate cu timidină) şi că celulele sensibilizate sînt capabile să transfere imunitatea de transplantare, cu observaţiile lui Mitchinson şi Dube (425), potrivit cărora acest fenomen se întîlneşte şi în eliminarea unor homografe tumorale solide, Najarian şi Feldman au emis ipoteza existenţei unui produs solubil pe care-l eliberează limfocitele sensibilizate şi care ar răspunde nemijlocit de eliminarea grefei. Însă, acest factor nu pare a fi înrudit cu anticorpii serici convenţionali, care se găsesc în serul animalelor cu homografe în curs de eliminare (240), deoarece perfuzarea serului de la donator sau a serului imun de la receptorul sensibilizat printr-o grefă de piele nu este capabilă de a transfera imunitatea de transplantare (581). Pentru obţinerea transferului imunităţii de transplantare este suficientă eliberarea continuă a acestui agent umoral din limfocitele sensibilizate închise în camerele milipore. Nu se poate susţine însă că acest factor nu este, totuşi, un anticorp, care în cazul transferului de ser nu are efect din cauza concentraţiei sale prea mici în curentul sanguin. Un argument în favoarea naturii de anticorp a acestui agent eliberat de limfocitele sensibilizate din camerele milipore este observaţia că, după efectuarea transferului de celule sensibilizate în camera miliporă şi introducerea ei în organismul şoarecelui, acesta începe să prezinte pierdere în greutate, atrofie limfatică şi alte semne caracteristice reacţiei grefă-contra-gazdă. De asemenea, este de remarcat că transferul imunităţii de transplantare se produce într-un mod diferit de cel observat în sensibilizarea la tuberculină, în care caz celulele specific sensibilizate se găsesc în număr semnificativ la locul de testare cu antigen specific (438). Transferul pasiv al sensi-

Scanned with OKEN Scanner

bilității la tuberculină nu se obține dacă celulele sensibilizate sînt închise în camere milipore impermeabile pentru celule. Este adevărat însă că experiențele de transfer al celor două tipuri de sensibilități nu s-au făcut în aceleași condiții: s-au folosit două specii diferite de animale, șoareci și cobai, și nu s-au făcut în paralel studii asupra transferului sensibilizării la tuberculină pe șoareci și invers, asupra transferului sensibilității față de homografe pe cobai.

Folosind o metodă asemănătoare, metoda camerelor de difuziune, Holub (291) a urmărit de asemenea rolul limfocitelor în imunitatea de transplantare și reacția la homografă, cercetînd în special proprietățile unui anumit tip de celulă limfoidă și anume limfocitul mic, pe care l-a obținut în suspensie aproape pură din canalul toracic. Pentru a evalua modificările suferite de limfocitul mic, ca urmare a contactului cu antigenul de transplantare, el a urmărit comportamentul acestei celule închise într-o cameră de difuziune, la animale cu autotransplante și animale cu homotransplante de țesuturi. Ca animale de experiență a folosit iepuri de rasă *Chinchilla*. După izolarea limfocitelor mici din canalul toracic prin gradiente variate de sucroză (20—40%) și după resuspendarea lor în ser omolog, amestecat cu soluție Hanks, celulele au fost puse în contact cu antigenul (în acest caz, albumina serică umană, ASH). Limfocitele au fost apoi plasate în camerele de difuziune și cultivate în acest loc. Paralel s-a introdus în alte camere de difuziune aceeași suspensie limfocitară, netratată însă cu antigen. După închidere, camerele au fost transferate în cavitatea peritoneală a iepurelui donator de celule sau la iepuri în viață de 5 zile, cunoscuți ca fiind incapabili de a forma anticorpi față de un antigen inclus într-o cameră de difuziune (585). Camerele au fost prelevate la diferite intervale de timp și celulele examinate ca atare, în contrast de fază, colorate cu verde Janus pentru mitocondrii sau cu verde de metilpironină. Filtrele camerelor de difuziune au fost supuse coloratiei pentru detectarea prezenței antigenului sau a anticorpilor pe ele, după tehnica de fluorescență a lui Marschall și colab. (376). Experiențele s-au făcut prin autotransplantare, cînd limfocitele tratate sau nu cu ASH au fost introduse în camere de difuziune implantate la aceeași donatori, și prin homotransplantare, cînd implantarea camerelor s-a făcut la alți receptori omologi. În cazul transplantării limfocitelor tratate cu ASH, lichidele din camerele de difuziune s-au investigat prin tehnica de microhemaglutinare a eritrocitelor tanate, pentru detectarea anticorpilor anti-ASH. La 4 zile după autotransplantarea lor, un număr mic de limfocite capătă forma de celule mari limfoide cu diametrul de peste 12 μ, asemănătoare ca aspect cu limfocitele medii obișnuite. Ele conțin nuclei vacuolați cu 2—4 nucleoli voluminoși și, ocazional, diviziuni mitotice aberante sau multiplicarea nucleilor. După 9 zile, tranziția acestor celule către histiocite tipice și histioblești, cu nuclei mari, prezentînd pironinofilie, este destul de frecventă. Citoplasma acestor histiocite este palidă. Ca număr, ele reprezintă aproximativ 10% din numărul limfocitelor inițiale. Formele reactive de limfocite sînt însă foarte rare. La 24 de ore de la homotransplantarea lor, citoplasma limfocitelor devine pironinofilă și ia aspectul limfocitelor mici în formă reactivă (așa-numitele limfocite de tipul II al lui Downey sau limfocitele de *stress* ale lui Dougherty). Numărul acestor forme crește progresiv. Tranziția este directă, mitoza în limfocitele mici observîndu-se foarte rar. În același timp, nucleolul mic, detectabil cu pironină, devine evident. Aceste limfocite în formă reactivă conțin un număr mai mare de mitocondrii decît

Scanned with OKEN Scanner

cele obișnuite, iar la contrast de fază prezintă zone frecvente de citoplasmă întunecată. După 8—11 zile de cultivare, cantitatea lor atinge 2—3% din numărul inițial de celule. În cazul cultivării în prezența ASH, numărul lor crește pînă la 5%. După 6 zile de cultivare apar și elemente plasmocitoide, caracterizate printr-o pironinofilie marcată a citoplasmei sau prin migrarea mitocondriilor din zona perinucleară. Nucleul este clar, cromatina dispusă în bloc, nucleolii evidenți, iar marginile citoplasmei au vacuole și incluzii în genul corpilor Russell. Dacă limfocitele s-au cultivat în absența ASH, numărul plasmocitelor este sub 1% din numărul inițial de celule, pe cînd, dacă s-au cultivat în prezența acestui antigen, numărul lor crește la 3,5%. În același timp, limfocitul se transformă din forma reactivă într-o formă foarte asemănătoare limfocitului mediu sau mare, care formează apoi o serie întreagă de celule de tranziție către histiocit, similare aceleia observată în experiențele de autotransplantare. În acest caz, numărul lor este însă mic (sub 1%). În timpul tranziției către histiocit, celulele execută frecvent funcții fagocitare (fagocitează resturile celulare sau limfocitele întregi moarte). Numărul total de histiocite formate prin cultivare atît în cazul adaosului de ASH, cît și fără adaos, poate atinge pînă la 5% din numărul limfocitelor suspensiei originale. Ele conțin numeroase vacuole și un abundent material fagocitar și nuclei palizi, uneori cu nucleoli (deci au unele caractere de histioblaste). Chiar în cursul tranziției spre celule gigante, nucleolii rămîn foarte evidenți. Unele forme de tranziție spre histiocite capătă o pironinofilie marcată a citoplasmei și caracter de elemente gigantice plasmocitoide. Tranziția spre plasmocit se face însă direct din limfocitul mic reactiv și numai ocazional prin intermediul unei celule mari cu caracter de limfocit mediu. Prin metoda lui Cohn și Hirsch (127), antigenul a putut fi regăsit la marginea citoplasmei cam la 40% din limfocite, începînd din a 4-a zi de cultivare. Anticorpi anti-ASH s-au putut detecta în 50% din celulele plasmocitoide și în 5% din limfocitele mici în formă reactivă. Unele celule, în special cele tinere și mai puțin diferențiate, au prezentat zone granulare sau inelare pozitive pentru anticorpi în interiorul nucleului, care corespund zonelor întunecate din microscopia în contrast de fază. Astfel de zone nu au apărut niciodată în limfocit înainte de cultivare. Microhemaglutinarea a arătat titruri joase de anticorpi în toate culturile de limfocite mici în prezența ASH (1/2 pînă la $^1/_{16}$).

Așa cum reiese din aceste date experimentale, procentul de limfocite mici circulante în canalul toracic al iepurelui, care au capacitatea de a se diferenția într-o serie de forme reactive încheiate de forme plasmocitoide producătoare de anticorpi, nu depășește 10%. Rezultatele obținute nu demonstrează că limfocitul mic ar fi o celulă tipică de multipotențialitate. Ele sugerează mai curînd că această populație omogenă morfologic nu este în mod necesar omogenă și din punct de vedere metabolic. Unele din limfocitele mici circulante își păstrează capacitatea de a se transforma în alte tipuri de celule și chiar de a forma anticorpi, dar în această privință nu sînt la fel de eficace ca celulele plasmocitoide. Experiențe similare făcute pe limfocite mici de origine timică au arătat că acestea sînt inferioare, ca reactivitate, acelora din canalul toracic. În homotransplantare, limfocitul mic îndeplinește funcții care pot fi incriminate în eliminarea homografei și reacțiile de hipersensibilitate. Limfocitul plasmocitoid ce conține anticorpi și, probabil, chiar histiocitul plasmocitoid derivat ar

Scanned with OKEN Scanner

putea fi tipuri de celule producătoare și adsorbante pasiv de anticorpi, care se acumulează în nucleu. Ele nu sînt în mod necesar celule secretoare de anticorpi ca plasmocitele adevărate, însă rolul lor într-o reacție imună antigen-anticorp este posibil și chiar verosimil. Limfocitul plasmocitoid ar putea elibera anticorpii săi numai prin dezintegrarea celulei și nu printr-o secreție ecrină sau apocrină. Aceste celule pot fi identice cu tipul de limfocit producător de anticorpi, cu indexul citoplasmic de refracție modificat (322), conținînd reticul endoplasmic (518) și pot chiar să circule în sîngele animalelor stimulate imunologic (152). Ele pot reprezenta tipul sugerat de Wissler și colab. (637) ca existînd în stadiul final în ganglionul limfatic al șobolanului stimulat.

Un alt mod de a studia rolul limfocitului în reacția față de homografă este de a urmări modificările grefei la receptorul supus unei depleții cronice de limfocite. Un astfel de model experimental se poate realiza prin stabilirea unei fistule permanente a canalului toracic. Unii autori (257), care au folosit această metodă în cercetări pe șobolani, au obținut o inhibiție importantă a producerii de anticorpi la animalele respective, stimulate cu diferite antigene, ca toxoid tetanic sau eritrocite de oaie. O altă modalitate de scădere profundă a numărului limfocitelor este administrarea repetată de seruri antilimfocitare heteroimune. Această metodă a fost utilizată de unii autori (640) pentru a urmări comportamentul grefelor de piele și de țesuturi endocrine. Limfocitopenia obținută pe această cale nu poate fi menținută însă mai mult de 10 zile, iar efectele ei asupra supraviețuirii grefelor nu sînt semnificative. Combinarea acestor două metode a fost încercată de Woodruff și Anderson (643). La șobolanii cu depleție a sistemului limfatic, realizată fie prin drenarea limfocitelor din canalul toracic fistulizat, fie prin injectarea de seruri heteroimune antilimfocitare (ser de iepure antișobolan), fie prin combinarea acestor metode, s-a evidențiat prelungirea supraviețuirii grefei de piele (643). Drenajul canalului toracic prin fistulă face posibil un TMS de 13 zile față de TMS de 8 zile la animalele de control, iar administrarea de seruri heteroimune face posibil un TMS de 16 zile. Combinarea celor două metode în pretratamentul animalelor purtătoare de grefe prelungește TMS la 31 de zile. Continuarea administrării de ser imun după aplicarea grefelor dă rezultate neconcludente. Astfel, din 7 animale supuse acestui tratament, unul a avut o grefă viabilă după 168 de zile, 2 au murit cu grefe viabile după 89 și 91 de zile, iar celelalte 4 au eliminat grefele după 19, 20, 75 și 133 de zile (643).

Modul de acțiune a serului antilimfocitar nu este lămurit, dar modificările histologice ale splinei și ganglionilor limfatici sugerează că el ar distruge limfocitele, care ar fi eliminate apoi prin intermediul histiocitelor. Woodruff și Anderson (643) consideră aceste rezultate ca fiind încurajatoare pentru chirurgia plastică, dar alte opinii *pro* sau *contra* au fost emise. Dacă limfocitele mici inițiază reacția la homografe, atunci este de așteptat ca injecțiile de limfocite mici de la donatori normali singenici să ducă la eliminarea grefelor animalelor tolerante. Billingham și colab. (62) au arătat că administrarea celulelor limfatice normale duce la abolirea toleranței față de grefele de piele la șoarece, ceea ce demonstrează că starea de toleranță a unui animal este expresia unui deficit morfofuncțional al țesuturilor lui limfoide. Ulterior s-a demonstrat că țesutul limfatic al animalelor tolerante poate fi refăcut prin administrarea de limfocite periferice (74) sau de celule din canalul toracic (65, 66, 251, 253).

Scanned with OKEN Scanner

Folosirea în acest scop a limfei, din care limfocitele mari au fost îndepărtate, a demonstrat că tipul de celulă eficace este limfocitul mic. Astfel, administrarea intravenoasă a 50 milioane limfocite mici (împreună cu 0,1% limfocite medii) a dus la distrugerea unor grefe de piele, tolerate de mult timp, la 9 din 12 şobolani, adică la 75% din animale (255). În experienţele de acest tip, este posibil ca activitatea limfocitelor injectate să nu fie stimulată de către antigenele din grefele de piele, ci de ţesutul himeric derivat din inoculul neonatal prin care s-a indus, de obicei, imunotoleranţa faţă de aceste grefe (66, 256). Aşadar, se poate presupune că factorii care distrug grefa de piele sînt rezultatul unei reacţii grefă-contra-gazdă în ţesutul limfatic al animalului tolerant (252). Modificările celulare observate în ţesutul limfatic în timpul distrugerii homografelor de piele confirmă această ideie. Reacţia nu se limitează la ganglionul regional; celulele mari pironinofile derivate din limfocitele mici injectate se pot detecta în splină şi diferiţi ganglioni limfatici nedrenanţi ai grefei de piele (256).

2. ROLUL TIMUSULUI ÎN IMUNITATEA DE TRANSPLANTARE ŞI ÎN PROCESUL DE ELIMINARE A HOMOGREFELOR

În ultima vreme se insistă asupra rolului deosebit pe care-l deţine timusul în apariţia imunităţii de transplantare. O serie mare de fapte experimentale aruncă o lumină cu totul nouă asupra funcţiilor acestui organ. Astfel, injectarea unor celule timice la un şoarece adult s-a dovedit capabilă să declanşeze eliminarea de tip accelerat a homografelor de piele, pe cînd injectarea acelorași celule la şoarecele nou-născut induce imunotoleranţa faţă de aceste grefe (72), ceea ce demonstrează că celulele timice sînt transportoare de antigene de transplantare. Ele sînt reactive imunologic. Spre deosebire însă de ganglionii limfatici şi splină, timusul nu-şi modifică volumul în cursul eliminării unei homografe decît dacă antigenul este injectat direct în parenchimul său.

Rolul timusului în procesele imunologice apare complex. El este sediul unei proliferări limfatice intense, limfocitele produse părăsind glanda pe cale sanguină. Timusul ar putea juca un rol în „instruirea" genetică a celulelor limfatice, făcîndu-le receptive la informaţii adecvate. Auerbach (27) şi Burnett (99) sînt de părere că timusul ar fi organul primordial al ţesutului limfatic şi, deci, al aparatului formator de anticorpi. Alţi autori (177, 405) presupun că timusul ar produce o substanţă solubilă, care ar modifica, ar influenţa şi ar regla activitatea sistemului limfatic, după tipul de acţiune a unui hormon. De altfel, rolul ablaţiei timusului în modificarea răspunsului receptorului la homografă a făcut obiectul unor cercetări interesante (380, 412). Amănunte asupra acestei probleme urmează a se prezenta în continuare.

a) **Efectele timectomiei asupra capacităţii de răspuns imunologic faţă de transplantele de organe şi ţesuturi.** S-a menţionat anterior că limfocitul mic iniţiază reacţia imunologică de transplantare (59, 253, 291, 393, 439, 440, 627). La rozătoarele tinere, de exemplu, ţesutul cel mai eficace în producerea limfocitelor mici este tocmai timusul. De altfel, timectomia la majoritatea animalelor adulte se asociază, în genere, cu o diminuare a numărului limfocitelor din canalul toracic, sîngele periferic, ganglionii limfatici şi splină (53, 406), iar timectomia practicată la vîrste tinere este urmată de o scădere mai marcată a numărului de limfocite (519). Aşa cum s-a arătat şi în capitolul I, timusul este,

Scanned with OKEN Scanner

în special la animalele tinere, o sursă importantă de limfocite, destinate să colonizeze splina și celelalte țesuturi limfatice, iar timectomia practicată la animale nou-născute se poate asocia cu întîrzierea și alterarea dezvoltării capacității lor imunologice (415). Acest fapt s-a putut demonstra urmărindu-se la animale efectele timectomiei asupra populației limfocitare și a capacității de imunizare față de țesuturile transplantate. Studii ample asupra acestor probleme au fost făcute de Miller (410—420). Timectomia practicată la șoareci nou-născuți se însoțește de depleția limfocitelor și alterarea gravă a răspunsului imun al animalelor față de homografele și heterografele de piele. Clinic, șoarecii se mențin aparent sănătoși timp de 2—4 luni, după care 70% dintre ei mor cu un sindrom de cașexie progresivă și diaree. Timectomia la animale tinere este urmată de scăderea răspunsului imun față de homografa de piele, în special dacă donatorul și receptorul sînt apropiați din punct de vedere genetic. Timectomia practicată la 3 săptămîni de la naștere nu se asociază cu modificări la fel de importante ale imunității față de homografă. Șoarecii timectomizați neonatal, cărora li s-a grefat ulterior țesut timic, elimină homografele de piele și, deci, reacționează imunologic. Țesutul limfatic al șoarecilor nou-născuți timectomizați, receptori ai unor grefe de timus, are un aspect normal și conține celule derivate din grefa de timus. Splenomegalia, indusă printr-o reacție grefă-contra-gazdă la acești șoareci nou-născuți timectomizați, se întovărășește de o proliferare celulară masivă, avînd originea în mod predominant la donator.

Toate observațiile converg către ideia că în perioada timpurie a vieții, timusul ar produce elementele originale ale celulelor competente imunologic, care s-ar matura și ar migra către alte țesuturi și organe. Aceasta nu exclude, însă, posibilitatea ca timusul să elaboreze un factor hormonal cu rol în dezvoltarea sistemului limfatic. Efectul imunologic depresiv al timectomiei s-a dovedit a fi legat de vîrsta la care s-a practicat operația și de diferențele de maturitate imunologică la naștere între diverse specii de animale (24, 198, 362).

Prelungirea supraviețuirii grefelor de piele după timectomie neonatală s-a obținut numai pentru șoarecii cu identitate de *locus* H-2 de histocompatibilitate și șoareci omologi, adică avînd deosebiri numai la nivelul celorlalți *loci* genetici (380, 412).

Timectomia efectuată la șoareci nou-născuți permite însă acceptarea de către animale a unui țesut tumoral și dezvoltarea tumorii, originea acesteia fiind la un șoarece care se deosebește de receptorul timectomizat la nivelul *locus*-ului H-2 (379). La șoarecii timectomizați la naștere se obține o inhibiție completă a răspunsului imun față de bacteriofagul T2 (153, 379). Dalmasso și colab. (155) au reușit să obțină supraviețuirea unei grefe de piele la animale timectomizate la naștere, la care diferența față de donatorul de grefă a fost la nivelul *locus*-ului major de histocompatibilitate H-2 (șoareci din liniile genetice DBA/2 și C3H sau C3H și A×C3H) F_1. În aceleași condiții, ei au obținut și abolirea barierii histocompatibilității legate de sex (fenomenul Eichwald-Silmser), femele din linia genetică CABL, timectomizate la naștere, primind și păstrînd izografe de piele de la donatori masculi din aceeași linie genetică, aplicată la o dată ulterioară. Într-adevăr, dacă numai 5—10% din timus rămîne neextirpat, imunitatea de transplantare evoluează aproape normal. Alte efecte, secundare, ale timectomiei la naștere sau la scurt timp după naștere sînt:

Scanned with OKEN Scanner

susceptibilitatea mărită a animalelor de a face o reacţie grefă-contra-gazdă (476) şi incapacitatea de a dezvolta reacţia de sensibilizare de tip întîrziat (25).

Se poate afirma, pe baza datelor experimentale disponibile în prezent, că timusul deţine un rol foarte important în dezvoltarea capacităţii imunologice totale. Deşi unii autori (26, 80, 304, 362) au susţinut că timusul intact nu produce anticorpi la animalele imunizate şi nu suferă modificări histologice, asemănătoare celor observate în celelalte ţesuturi limfatice, ca urmare a administrării parenterale de antigen, totuşi, reinvestigaţia acestui organ sub aspect imunologic a impus reconsiderarea acestor opinii. Celulele timice sînt capabile de a produce sindromul de *runt,* ceea ce arată că ele au capacitatea imunologică deplină. Injectarea directă a unor antigene (bacili tifici şi paratifici omoriţi prin căldură, polizaharide pneumococice etc.) în timusul de cobai determină apariţia unor centri germinativi şi a celulelor plasmocitare, ca şi formarea de anticorpi (377). Timusul normal de şobolan şi cobai posedă o barieră puternică împotriva pătrunderii coloranţilor vitali sau a antigenelor din fluxul sanguin în glandă; această barieră poate fi depăşită numai prin traumatism local.

După iradiere cu doze letale sau subletale de raze Röntgen, şoarecele adult are nevoie de prezenţa timusului pentru recuperarea capacităţii de a răspunde la homografă (601), dar nu şi la heterografă. Recuperarea capacităţii de a elimina heterografele (şobolan donator, şoarece receptor) nu este legată de un mecanism dependent de timus, mecanism primordial în cazul grefelor de ţesuturi între membrii aceleiaşi specii (601).

b) **Rolul timusului în imunitate şi în toleranţa faţă de ţesuturile transplantate.** De mult timp se dezbate problema rolului timusului în procesele imunologice. Argumentele experimentale pledează fie în favoarea, fie în defavoarea existenţei unei funcţii imunologice a timusului.

Pe scurt, argumentele negative sînt: a) timusul intact nu produce anticorpi la animalele imunizate şi nu suferă modificări histologice asemănătoare acelora din ganglionii limfatici şi splină, ca urmare a administrării de antigene (26, 190); b) la animalele adulte, timectomia se asociază cu o depresiune slabă şi nesemnificativă a formării anticorpilor (26, 190). Pe de altă parte există însă numeroase observaţii care atestă rolul timusului în controlul răspunsului imun: a) în viaţa postnatală, cînd animalul este foarte sensibil la influenţele externe asupra sistemului său imun, organul limfatic major este reprezentat de timus; b) în cursul infecţiilor acute, ca urmare a nevoii crescute de anticorpi, se produce, în mod obişnuit, o involuţie rapidă a timusului, în timp ce la bolnavii cu agammaglobulinemie cîştigată apar adesea tumori timice benigne (timoamele); c) timectomia practicată la şoareci de o lună previne infecţia virotică din leucemia limfocitară virotică a şoarecelui, în cazul că infectarea animalelor cu virus s-a făcut imediat după naştere; virusul nu este distrus, ci continuă să supravieţuiască la animalul timectomizat, fără a produce însă manifestări clinice (262, 355, 410).

Folosind în unele experienţe şoareci nou-născuţi timectomizaţi, Miller (412, 413) a ajuns la concluzia că, în prima perioadă a vieţii, rolul timusului în dezvoltarea răspunsului imun este deosebit de important (cel puţin la şoareci, specie pe care a utilizat-o în experienţele sale).

Încercînd să stabilească rolul timusului în imunitatea de transplantare, Miller (414) a efectuat o serie de experienţe interesante. Ca animale de experienţă, el a folosit şoareci nou-

născuți din diferite linii genetice pure și hibrizi de tip F_1, cărora le-a practicat timectomia la naștere. Pentru control s-au utilizat animale fals-timectomizate (cărora li s-a practicat numai traumatismul operator). Timusurile recoltate aseptic au fost grefate subcutanat în axila unor receptori adulți, în vîrstă de 2—3 săptămîni. Șoarecilor timectomizați li s-a grefat apoi, la diferite intervale de timp, piele recoltată de la șoareci adulți de 1—2 luni, de ambele sexe, precum și de la șobolani adulți de ambele sexe din rasa Wistar. Pentru control, aceleași grefe au fost aplicate șoarecilor fals-timectomizați, ca și unor șoareci adulți normali. Rezultatele sînt redate în tabelele 24 și 25. Din aceste tabele reiese că timectomia în perioada neonatală se

Tabelul 24

Supraviețuirea homografelor de piele la șoareci C3H timectomizați *

Tratamentul	Donatorul de piele	Numărul de șoareci C3H cu grefe	Numărul de șoareci grupați după durata supraviețuirii grefei de piele		
			25 de zile	25—60 de zile	>60 de zile
Timectomie la naștere	AK	7	0	2	5
	BALB/C	5	1	2	2
	șobolan	4	2	2	0
Falsă timectomie la naștere (control 1)	AK	6	6	0	0
Timectomie la 4—7 zile după naștere	AK	12	4	8	0
	BALB/C	7	6	1	0
Timectomie la 3 săptămîni	AK	16	16	0	0
Șoareci normali netratați (control 2)	AK	61	61	0	0
	BALB/C	11	11	0	0
	șobolan	4	4	0	0

* După Miller (414).

Tabelul 25

Supraviețuirea homografelor de piele la șoareci (AK×T_6) F_1 timectomizați *

Tratamentul	Donatorul grefonului de piele	Numărul de șoareci (AK×T_6)F_1 cu grefe	Numărul de șoareci grupați după durata supraviețuirii grefei de piele		
			<25 de zile	25—60 de zile	>60 de zile
Timectomie la naștere	C3H	21	2	7	12
	C57BL	13	3	5	5
	BALB/C	10	3	3	4
	DBA/2	5	1	2	2
	șobolan	13	8	4	1
Falsă timectomie	C3H	6	6	0	0
	C57BL	5	5	0	0
	BALB/C	5	5	0	0
	șobolan	5	5	0	0
Timectomie la 3 săptămîni	C3H	12	12	0	0
Șoareci normali netratați	C3H	10	10	0	0
	BALB/C	4	4	0	0

* După Miller (414).

Scanned with OKEN Scanner

asociază cu prelungirea supraviețuirii grefei provenite nu numai de la donatorii care se deosebesc de receptor prin *locus*-ul H-2 (donatori din liniile genetice C3H, C57BL, BALB/C și DBA/2) și receptor hibrid $(AK \times T6)F_1$, dar și de la donatorii de specii diferite [donator șobolan Wistar sau șoareci C3H și receptor $(AK \times T6)F_1$]. Pe aceste grefe de piele, părul crește în mod normal. Eliminarea grefelor, cînd survine, se face treptat, prin subțierea pielii, fără semne de eritem, edem, sîngerare etc. În experiențele lui Miller (412, 413), niciunul dintre șoarecii care au eliminat grefa după 25 de zile, nu a murit cu sindrom de *runt*. Șoarecii care au menținut grefele de piele de șobolan între 25 și 60 de zile, în schimb, au murit din cauza sindromului de *runt*, avînd grefa intactă în momentul morții. Majoritatea deceselor prin sindrom de *runt* au survenit la șoarecii care au menținut grefa peste 60 de zile. De asemenea, s-au efectuat o serie de teste privind transferul imunității prin adopțiune. În acest scop, animalele adulte au fost imunizate cu două grefe succesive de piele și celulele a două timusuri și două spline. După 8 zile s-au recoltat de la aceste animale celule limfatice ganglionare și splenocite, care au fost transferate prin injecții intraperitoneale la receptori adecvați, în doze de 20—50 de milioane celule sensibilizate. Dintre aceste animale, 4 șoareci timectomizați neonatal, cărora li s-au aplicat grefe de piele de la șoareci din linia AK, au fost inoculați la o lună după grefare cu celule limfatice de la șoareci din linia C3H, sensibilizate în prealabil cu țesuturi AK. Toți acești șoareci au prezentat o reacție severă, la nivelul grefei de piele, după 12 zile de la administrarea celulelor sensibilizate. Dacă acestor șoareci li s-a făcut concomitent o grefă de timus, s-a asistat, după 15—30 de zile, la restaurarea reactivității lor imunologice, cu eliminarea consecutivă a grefelor de piele. Histologic, șoarecii timectomizați la naștere au prezentat la 6 săptămîni de la operație o limfopenie marcată, mergînd pînă la 50% față de normal. De asemenea s-a observat o involuție marcată a întregului sistem limfatic: ganglioni limfatici mici, plasmocite în număr scăzut, splină ratatinată, fără structură foliculară, fără limfocite și fără plasmocite. Mortalitatea postoperatorie (în primele 2 luni) a animalelor timectomizate este de 50%.

Depleția masivă a țesutului limfatic și defectele imunologice marcate, observate la șoarecii timectomizați la naștere, demonstrează că, în timpul vieții fetale și, posibil, în viața postnatală, timusul este organul în care iau naștere celulele de origine ale viitoarelor celule competente imunologic, care migrează și se maturizează în organism (412), ceea ce confirmă ipotezele altor autori (27, 99), potrivit cărora timusul reprezintă elementul major al sistemului imunologic. Există corelații asemănătoare și la alte specii de animale: puii cărora li s-a îndepărtat bursa (echivalentul timusului la păsări) la naștere nu produc anticorpi (432), iar șobolanii timectomizați la naștere nu produc ulterior anticorpi față de albumina serică bovină (23). Aceleași fenomene s-au semnalat la cobai, iepuri, hamsteri (23). Situația apare însă diferită la cîine. Fisher și colab. (206) au făcut homotransplante renale la cîini de 3—6 luni, timectomizați în primele 24 de ore de la naștere și au observat că imunitatea de transplantare nu a fost influențată de ablația timusului, supraviețuirea rinichiului transplantat fiind sensibil egală cu aceea a martorilor netimectomizați. Histologic, cele două tipuri de grefe renale eliminate au fost foarte asemănătoare. Țesutul limfatic al cîinilor timectomizați a fost la fel de bine reprezentat, ca și la martori. Deci, la cîine, timusul nu pare a avea un rol determinant în răspîndirea periferică a celulelor competente imunologic (206). Cu excepția lui Than și colab. (589), care au obținut supraviețuirea prelungită a grefelor de piele la cîini timectomizați la o lună de la naștere, ceilalți autori (113, 466), care au urmărit aceste aspecte, au confirmat datele lui Fisher și colab. (206). Lipsa de modificare a reacției de eliminare a homografelor după timectomie la adult a fost semnalată și la om (571).

Una dintre caracteristicile de bază ale stărilor de deficit imunologic (toleranță imunologică, lipsă de răspuns imunologic sau paralizie imunologică, după expresia lui Felton) este deficitul funcțional al celulelor formatoare de anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpi. Absența fizică a celulelor formatoare de anticorpi pare a caracteriza șoarecii timectomizați la naștere (414). De aici se poate deduce că pentru inducerea toleranței imunologice ar fi suficient să se efectueze o timectomie parțială, selectivă, funcțională și nu una chirurgicală. Cu alte cuvinte, celule sau antigene injectate ar trebui, venind în contact cu anumite celule din timus, să prevină într-un mod oarecare evoluția celulelor injectate pînă la stadiul în care devin capabile de a reacționa imunologic. Însă, pentru a admite această teorie, trebuie să se demonstreze că celulele sau antigenele injectate ajung în timus, că diferitele funcții imunologice ating dezvoltarea deplină în momente diferite, că celulele imature sînt mai susceptibile să fie eliminate funcțional decît cele adulte și că aceste celule migrează din timus către alte țesuturi. Există unele date experimentale care pledează pentru această teorie. Gowans și colab. (253) au arătat că limfocitele mici marcate cu tritium și injectate la șobolan au ceea ce se numește un „instinct de domiciliu" *(homing instinct)*. Ele se regăsesc totdeauna în ganglioni, splină, plăcile Peyer, măduva osoasă și niciodată în timus. Albastrul de tripan sau antigenele pneumococice polizaharidice, injectate parenteral la cobai, nu sînt absorbite de timusul normal (377). Acestea sugerează existența unei bariere față de pătrunderea în timus a celulelor sau materialului antigenic. Rațional, rolul acestei bariere se explică dacă admitem că celulele competente imunologic se diferențiază în timus chiar în viața postnatală și că sînt foarte susceptibile de a fi eliminate funcțional, atît timp cît ele sînt imature. Această barieră, a cărei existență a fost demonstrată la animalul adult, poate fi depășită imediat după naștere, cînd timusul animalelor cărora li s-au injectat celule străine vii pentru inducerea imunotoleranței s-a dovedit a conține o populație formată din aceste celule (8). În ceea ce privește sistemul diferit, ca timp, de maturizare a facultăților imunologice, s-a văzut că, pe măsură ce timectomia se practică mai curînd, șoarecele devine mai incapabil să elimine chiar heterografe (de exemplu, grefe între șoarece și șobolan) (414). După grefa de timus, la animalele timectomizate, care duce la restaurarea capacității de eliminare, grefa cea mai îndepărtată din punct de vedere genetic este eliminată prima, pe cînd grefele mai apropiate de receptor din acest punct de vedere, sînt eliminate mai tîrziu.

S-a sugerat că limfocitele părăsesc timusul. Numărul mitozelor este de 4—6 ori mai mare în timus, în comparație cu alte organe limfatice, iar metabolismul ADN este de 2—5 ori mai activ (53). Pe de altă parte, moartea celulelor în timus este foarte limitată (doar 15% din producția totală) (355). O evidență clară privind însămînțarea sistemului limfatic cu celule originare din timus s-a obținut recent prin marcarea directă a celulelor timice de cobai cu ^{3}H-timidină (462). La animalele nou-născute, proporția de limfocite ganglionare derivate din timus este cea mai mare; urmează, în ordine descrescîndă, animalele tinere și apoi animalele adulte la care numărul de limfocite cu origine timică este foarte mic în ganglionii limfatici. Majoritatea celulelor eliberate de timus sînt limfocite mici. Ele intră în ganglioni prin venulele postcapilare și se localizează în zona corticală. Marea lor majoritate nu suferă vreo transformare în alte tipuri celulare (limfoblast, plasmocit, macrofag), chiar dacă sînt stimulate cu antigen. Ritmul crescut de însămînțare a sistemului limfatic cu limfocite timice la animalele nou-născute subliniază rolul vital al timusului la această

Scanned with OKEN Scanner

vîrstă. Totuşi, nici chiar la această vîrstă majoritatea limfocitelor proliferante nu pare a fi derivată recent din timus. Ţinînd seama de mărimea glandei şi activitatea ei mitotică ridicată, se poate presupune că majoritatea limfocitelor timice iau naştere în glandă, au o viaţă scurtă şi mor tot în glandă.

Timectomia la animale adulte se însoţeşte de oarecare scădere a populaţiei limfocitare din canalul toracic, sîngele periferic, ganglionii limfatici şi splină (88, 406), în timp ce la animalele foarte tinere această operaţie este urmată de o scădere mai importantă a numărului de limfocite din canalul toracic şi ganglionii limfatici (519), de unde se poate deduce că ganglionii limfatici şi splina sînt destinaţii preferate ale limfocitelor timice. Aceste modificări după timectomie trebuie legate, însă, de producerea de către timus a unui factor stimulator al limfocitozei, a cărui existenţă a fost demonstrată de Metcalf (405).

Ce se întîmplă cu animalele timectomizate la naştere, care supravieţuiesc operaţiei? În ce măsură se restabileşte la aceste animale limfocitoza normală şi în ce măsură îşi recuperează ele capacitatea de a produce anticorpi? S-a arătat că la şoareci, timusul are un rol important în dezvoltarea mecanismului imunologic de apărare (380, 417). Timectomia neonatală inhibează producerea de anticorpi celulari şi umorali (416, 472), induce o evidentă lipsă de răspuns faţă de homografa de piele (497) şi determină apariţia unei marcate limfopenii circulante (498). Mortalitatea postoperatorie este mare, procentele de supravieţuitori fiind condiţionate de liniile genetice de şoareci folosite (477). Urmărind comportarea unor asemenea supravieţuitori în ceea ce priveşte numărul limfocitelor periferice şi capacitatea de producere a anticorpilor tisulari şi serici, Rogister (499) a făcut cîteva observaţii interesante. În primele 120 de zile după timectomie, numărul limfocitelor rămîne scăzut, ca apoi să crească şi să redevină normal. La 30 de zile de la naştere, şoarecii normali formează aglutinine serice specifice faţă de hematiile de oaie, iar reinjectarea acestor hematii la 60 de zile duce la creşterea titrului de aglutinine. În cazul şoarecilor timectomizaţi nu apar aglutinine după injectarea hematiilor de oaie la 30 de zile, în schimb, după a doua injecţie de hematii, la 60 de zile, aglutininele apar şi titrul lor este egal cu acela al şoarecilor normali. La şoarecii de o săptămînă, cantitatea de γ-globuline serice este egală la şoarecii timectomizaţi cu aceea a şoarecilor normali (304, 500). Eliminarea grefei de piele se face de asemenea cu atît mai repede, cu cît animalul este mai în vîrstă, intensitatea reacţiei fiind normală după 40—60 de zile. În concluzie, la şoarecii care supravieţuiesc timectomiei neonatale are loc după 2 luni recuperarea progresivă a competenţei imunologice. Timectomia extinde pe o perioadă de timp incompetenţa imunologică a animalului nou-născut (88) şi, implicit, prelungeşte durata perioadei în care animalul poate fi făcut tolerant la o homografă de piele.

3. ROLUL ŢESUTULUI CONJUNCTIV ÎN PROCESUL DE SENSIBILIZARE LA HOMOGREFE

Billingham şi colab. (65, 66) au făcut o serie de constatări care sugerează că ţesutul conjunctiv ar putea avea rol în procesul de sensibilizare faţă de homografe. Astfel, ei au observat, în experienţe pe hamsterul sirian, că ţesutul conjunctiv alveolar, lax, de sub epiteliul pungii jugale a acestui animal, prezintă proprietăţi interesante: a) homografele şi chiar heterografele de piele,

plasate în patul acestui țesut supraviețuiesc la infinit, în timp ce aceleași grefe plasate pe același animal în alte locuri sînt eliminate prompt; b) dacă aceluiași receptor i se aplică o a doua grefă de piele de la același donator, însă în alt loc decît prima grefă de piele, plasată în punga jugală, ambele grefe sînt eliminate la fel; c) transferarea țesutului conjunctiv din punga jugală în altă zonă a organismului animalului nu influențează toleranța țesutului transferat față de homografe și heterografe. Ipoteza emisă pentru a explica aceste fenomene este că țesutul mezenchimal al pungii jugale a hamsterului sirian interceptează, printr-un mecanism oarecare, calea aferentă a reflexului imun, ceea ce face din această zonă unul din locurile privilegiate pentru transplantare.

McKahn și Berrian (390) au insistat asupra importanței vascularizației în declanșarea sensibilității față de homografă. În funcție de timp (2—6 zile), se poate obține un gradient în sensibilizarea receptorului față de o a doua grefă de piele de la același donator, ca urmare a contactului dintre grefă și țesutul conjunctiv al gazdei. De asemenea, în prelungirea supraviețuirii grefelor de piele prin cortizon este evidentă relația dintre menținerea vascularizației și aspectul normal al grefei (595). Receptorul este incapabil să efectueze eliminarea grefei un anumit interval de timp după grefare, ceea ce sugerează că, între calitatea țesutului bazal și durata acestei perioade critice, la sfîrșitul căreia se realizează sensibilizarea gazdei și îndepărtarea țesutului străin, există o legătură strînsă. Intervalul critic de contact, necesar pentru ca o grefă mică de piele omologă să fie recunoscută de gazdă, este de 48 de ore, după care, în funcție de mărimea duratei de supraviețuire a grefei, se poate vorbi despre un gradient al răspunsului imun (139, 248, 390). La șoareci, același interval critic există chiar în cazul grefelor mari de piele (248). Interferența manevrei chirurgicale cu circulația limfatică a zonei de grefare afectează în mod cert durata declanșării reflexului imun. Este important de semnalat că dimensiunile grefei de piele nu influențează intervalul de timp necesar pentru contactul grefă-gazdă și declanșarea mecanismului sensibilizării acesteia. Țesutul conjunctiv din patul unei grefe are proprietatea de a transfera starea de sensibilizare dobîndită de gazdă la un alt animal indemn, de aceeași linie genetică, permițînd desfășurarea unei reacții de tipul imunității prin adopțiune. În consecință, se poate afirma că țesutului conjunctiv îi revine un rol bine definit în transferul informației antigenice în cursul răspunsului organismului față de homografe (248).

E. MECANISMELE EFECTORII ÎN ELIMINAREA ȚESUTULUI TRANSPLANTAT

În prezent, există două puncte de vedere asupra căii prin care homografele vascularizate sînt distruse. Observațiile lui Mitchinson (421, 422) și Billingham și colab. (59) asupra transferului prin adopțiune a sensibilității la homografă cu ajutorul celulelor din ganglionii limfatici sugerează că celulele limfatice „activate", eliberate din ganglionii limfatici regionali, pot circula în sînge și pe această cale pot ajunge în țesutul grefat, pe care, printr-un mecanism încă necunoscut, îl pot distruge. Eșecul transferării sensibilității față de homografă, cu ajutorul serului obținut de la donatorii sensibilizați, sugerează de asemenea că distrugerea homografelor se datorește, în primul rînd, celulelor limfatice

Scanned with OKEN Scanner

activate (64, 107). Pe de altă parte, Stetson (579) este de părere că anticorpii ar avea rolul cel mai important în distrugerea tuturor tipurilor de grefă. Sigur este însă numai faptul că celule activate imunologic apar în sîngele animalelor după aplicarea de homografe de piele (65, 74). Billingham şi colab. (66) au studiat apariţia acestor celule după aplicarea de homografe de piele la şoarece, prin testarea capacităţii leucocitelor sanguine şi a celulelor limfatice ganglionare de a distruge homografele de piele la şoarecii toleranţi. Celulele activate au fost detectate în nodulii limfatici regionali şi în sînge la 6 zile după grefare; s-a constatat că în sînge, ele persistă timp de peste 1 an. Experienţe similare, efectuate pe şobolani, au arătat că celulele activate apar în limfa canalului toracic. Prezenţa lor în limfă sugerează că celula efectivă poate fi un limfocit mic, dat fiind că celulele pot ajunge din ganglionii limfatici regionali în canalul toracic numai dacă au trecut, în prealabil, prin curentul sanguin (250, 254). Limfocitele mici circulante pot explica, astfel, persistenţa îndelungată în sînge a celulelor activate şi împrăştierea activităţii de la nivelul ganglionilor limfatici regionali la celelalte ţesuturi. De altfel, aceste fapte îşi pot găsi o explicaţie şi în posibilitatea de colonizare a altor ganglioni limaftici de către limfocitele mari, care pătrund în sînge din ganglionii regionali, pe calea eferentă limfatică. Persistenţa celulelor activate în sînge se poate interfera cu producerea celulelor cu viabilitate scurtă din precursorii care se divid în mod continuu. O alegere între aceste două posibilităţi nu poate fi făcută cu certitudine pe baza datelor existente pînă astăzi, dar prima variantă este mai atractivă (255).

Ideea că limfocitele activate distrug homografele nu este însă în concordanţă cu faptul că experienţele autoradiografice, făcute pentru detectarea celulelor donatorilor în grefă, au pus în evidenţă existenţa unui număr relativ scăzut de astfel de celule (75, 440). Numărul scăzut de celule detectate cu ajutorul acestei metode s-ar putea datori fie încorporării deficitare a ^{3}H-timidinei de către donator, fie pierderii substanţei marcate de către celulele donatorului, după ce au pătruns în grefă sau în cursul diviziunilor celulare. Pe de altă parte, nu este exclus ca modificările distructive din grefă să fie realizate de un număr mic de celule. Cercetările lui Prendergast (488) au arătat că celulele provenite din ganglionii limfatici invadează în număr substanţial grefa de piele. Celulele ganglionilor regionali par a avea un tactism deosebit pentru grefe, independent de tipul lor imunologic (investigaţia a fost făcută tot prin marcarea celulelor cu ^{3}H-timidină). Astfel, în experienţele lui Prendergast (488), 11% din celulele mononucleare din grefă au fost marcate, în timp ce procentul lor în sînge nu a depăşit 0,2%. Identificarea celulelor mononucleare, invadante, în grefe este greu de realizat practic. O serie de autori (406, 631) au găsit în ţesuturile grefate un amestec de macrofage, limfocite de diferite mărimi şi plasmocite. În imagini electronooptice, celulele care se găsesc în homografele în curs de eliminare la iepuri au fost descrise ca avînd dimensiunea limfocitelor mici, dar şi caractere comune limfocitelor mari şi macrofagelor (631). Experienţe recente *in vitro* sugerează ideea necesităţii unui contact direct între limfocitele activate şi celulele grefei, pentru ca distrugerea acesteia să aibă loc (502, 503). Observaţiile lui Govaerts (249) şi ale lui Wilson (634), potrivit cărora limfocitele din canalul toracic de la donatori sensibilizaţi pot distruge *in vitro* celulele grefei, au o impor-

Scanned with OKEN Scanner

tanţă deosebită, pentru că celulele canalului toracic pătrund, în mod obligatoriu, în curentul circulator. Wilson (634) a sensibilizat şobolanii donatori prin aplicarea unor homografe de piele, iar după 9 zile a adăugat celule din canalul lor toracic la o cultură de celule renale ale donatorului. Majoritatea celulelor renale au fost distruse după o incubaţie de 48 de ore, în timp ce majoritatea limfocitelor au rămas încă vii. Efectul citocid nu a reclamat prezenţa complementului sau a serului imun şi a fost asociat cu o aglomerare impresionantă a limfocitelor în jurul celulelor renale.

Se cunoaşte încă foarte puţin despre factorii sau circumstanţele care fac din limfocite celule activate imunologic în reacţiile de homotransplantare. Se pot invoca, pentru a explica aceste fapte, mai multe posibilităţi: a) activarea ar putea fi expresia unei modificări a suprafeţei celulare, ca urmare a unei sinteze specifice în interiorul fiecărei celule (anticorpi legaţi de celulă); b) ea ar putea fi dobîndită pasiv, ca rezultat al unei sinteze care are loc în altă parte (anticorpi citofilici); c) celulele ar putea să sintetizeze un anticorp solubil, deosebit de efectiv, care este eliberat, în mod normal, în interiorul grefei însăşi (332, 440).

F. REACŢIILE GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ

În reacţiile grefă-contra-gazdă — cunoscute în literatură sub nume diverse, ca: boală omologă, boală secundară, boală consumptivă, boală parabiotică sau sindromul de *runt* (*runt disease*), — au fost însumate reacţii imunologice variate, la care se adaugă în mod continuu reacţii noi, trăsătura lor comună fiind direcţia atacului imunologic, care accelerează procesele imunopatologice, de altfel foarte complexe, ale receptorului unei homografe. Direcţia acestui atac ar fi inversă în comparaţie cu aceea a atacului care duce la eliminarea grefei (34, 197, 219, 365, 596, 602, 604). Aceste reacţii nu se produc dacă ţesutul transplantat nu conţine celule competente imunologic, care să reacţioneze cu prioritate faţă de antigenele gazdei. Evidenţa asupra faptului că în reacţia grefă-contra-gazdă sînt afectate alte ţesuturi decît acelea de origine limfoidă sau eritroidă nu este concludentă (460).

În prezent, nu se poate stabili nici care ţesuturi conţin şi care ţesuturi nu conţin celule competente imunologic. De exemplu, pielea rozătoarelor pare a fi lipsită de un număr detectabil de celule competente imunologic, în timp ce pielea păsărilor domestice conţine astfel de celule (69, 561).

O problemă viu dezbătută este aceea dacă o anumită reacţie la homografă este o reacţie grefă-contra-gazdă sau, invers, o reacţie gazdă-contra-grefă sau şi una şi alta (222, 366). Există o evidenţă, cuprinzînd numeroase circumstanţe, care sugerează numai un singur răspuns la această problemă şi există de asemenea un criteriu principal, sigur, de evaluare a răspunsului imunologic, utilizabil dacă sînt disponibile animale de linie genetică pură şi anume grefarea ţesuturilor între aceste animale şi hibrizii lor F_1. Dacă reacţia este de tipul grefă-contra-gazdă, ea apare în cazul grefei de la animalul de linie genetică pură la un receptor hibrid [$A \rightarrow (A \times B)\ F_1$] (57, 505, 597), în timp ce reacţia gazdă-contra-grefă apare în condiţii inverse [$(A \times B)\ F_1 \rightarrow A$].

Scanned with OKEN Scanner

Considerînd că aceste condiţii de bază sînt îndeplinite, cu alte cuvinte că ţesutul grefat conţine celule competente imunologic şi că gazda conţine antigene de transplantare absente la donator, rămîne de stabilit momentul în care se produce reacţia.

Teoretic, s-ar putea admite că această reacţie are loc totdeauna, dar că deseori rămîne la un stadiu „subclinic". Raţionamentul este justificat de posibilitatea ca ea să scape mijloacelor de detectare atît timp cît organismul-gazdă o poate suprima prin reacţia opusă (dacă n-ar fi aşa, chiar o transfuzie convenţională de 500 ml sînge uman proaspăt ar trebui să se încadreze, din punctul de vedere al selecţionării donatorilor, în aceeaşi dificultate ca şi transplantarea rinichiului).

În general vorbind, există trei categorii de situaţii în care gazda nu reuşeşte să ţină sub control celulele grefei, adică în care reacţia grefă-contra-gazdă ar putea deveni manifestă (549): a) imaturitatea imunologică a reacţiei gazdei, cum se întîmplă de exemplu atunci cînd se homografează celule limfoide de la donatori adulţi la embrioni sau animale nou-născute; b) depresiunea indusă a reacţiei gazdei, care include atît depresiunea imunologică generală (ca în expunerea la radiaţii ionizante, tratamentul cu antimetaboliţi sau ablaţia timusului în perioada neonatală), cît şi depresiunea imunologică mai mult sau mai puţin specifică, realizată prin doze relativ mari de antigene izolate de la donator; c) anularea sau modificarea deliberată a reacţiei unei gazde normale, pe deplin competentă imunologic, printr-o manevră experimentală. O asemenea stare se realizează dacă celulele competente imunologic ale donatorului sînt injectate într-o anumită zonă, bine delimitată, unde se pot stabili temporar, suficient timp pentru a iniţia o reacţie locală grefă-contra-gazdă (90, 187, 622). Dominanţa grefei contra gazdei poate apărea de asemenea în mod sistematic în cazurile în care „forţa" relativă a antigenelor este suficientă pentru a favoriza răspunsul grefei şi nu al receptorului (reacţia grefă-contra-gazdă fiind provocată de antigene mult mai puternice în comparaţie cu acelea care provoacă reacţia gazdă-contra-grefă) (295, 296). Un asemenea exemplu este grefarea, menţionată mai sus, a unor celule de la animale de linie genetică pură la hibrizii lor F_1, la care se presupune că în mod normal nu are loc răspunsul gazdei (exceptînd, bineînţeles, posibilitatea existenţei unor antigene mascate, ascunse, la donatori).

Interesul pentru reacţiile grefă-contra-gazdă a difuzat în numeroase sectoare de cercetare biologică şi practică medicală din momentul în care, cu 8—10 ani în urmă, existenţa lor a devenit o certitudine. Tulburările pe care ele le provoacă reprezintă complicaţii serioase ale procedeelor de grefare clinică de ţesuturi, dar mai ales de măduvă osoasă (383). Însă, interesul clinicienilor pentru aceste reacţii se explică poate mai curînd prin similitudinea lor cu aşa-numitele boli autoimune, pentru înţelegerea cărora Burnet (101) a prezentat un model ipotetic grefă-contra-gazdă, sub forma „clonelor interzise". Patologiştii găsesc în reacţia grefă-contra-gazdă un bun mijloc de a aborda problemele fundamentale ale imunologiei generale, şi în special, ale mişcării populaţiilor de celule competente imunologic (548).

Scanned with OKEN Scanner

Emacierea, întovărășită de întîrzierea în creștere, dacă este vorba de animale tinere, reprezintă semnul clinic care a conferit numele sindromului în totalitatea sa. Moartea intervine adesea în evoluția animalelor cu acest sindrom, dar în cazurile moderate se produce de obicei remisiunea spontană a bolii.

Leziunile principale sînt larg răspîndite în sistemul limfatic și par a avea o natură bifazică. Prima fază se caracterizează prin dispariția limfocitelor normale din foliculii limfatici și prin înlocuirea concomitentă a acestora cu tipuri celulare proliferante, care sînt considerate ca membri pironinofili ai seriei de celule plasmocitare. A doua fază, care se întîlnește dacă receptorul trăiește suficient este dominată de atrofie și fibroză. Macroscopic, aceste două faze corespund creșterii de volum și, respectiv, scăderii de volum a tuturor formațiunilor limfatice, cu excepția timusului mamiferelor.

Splenomegalia și hepatomegalia reflectă modificările mai sus menționate ale organelor limfoide, cu toate că splina nu este un organ limfoid în toată puterea cuvîntului, iar ficatul nici măcar atît cît este splina. Traveele periportale ale ficatului participă totuși la realizarea tabloului morfologic al reacției grefă-contra-gazdă, cu modificări celulare de același fel ca și acelea descrise în organele limfoide în asemenea împrejurări.

Anemia imunohemolitică este tipul de anemie care se întîlnește mai des în reacțiile grefă-contra-gazdă la păsări, șobolani și iepuri și care se însoțește de pozitivarea testului direct al lui Coombs.

Leziuni de dermatită severă apar mai frecvent la rozătoarele mici și, în special, la șobolani.

În sfîrșit, diareea este un semn clinic remarcabil, mai ales atunci cînd boala are o evoluție prelungită. Deseori, mucoasa intestinală este sediul unor hemoragii difuze în această împrejurare (547, 548).

Splenomegalia este un semn precoce și constant al reacției grefă-contra-gazdă (58, 545). Deoarece în acest caz splenomegalia este mai curînd consecința unei proliferări a elementelor celulare decît aceea a unei proliferări stromale sau a unei creșteri a conținutului fluid (299), s-a presupus că mărirea masei splenice ar putea fi în parte determinată, atunci cînd reacția grefă-contra-gazdă a fost provocată prin administrarea de limfocite omologe la receptori puși în situația unei scăderi a capacității de apărare imunologică, de fixarea și proliferarea în splină a acestor limfocite. Proba directă că astfel se pot desfășura lucrurile a fost făcută de cercetările lui Biggs și Payne (54) pe embrioni de găină, folosind cromozomii sexuali ca trasori. Pe de altă parte, însă, Davies și Doak (159) au injectat celule splenice de șoarece, ca un trasor citologic (de origine mutațională) la receptori omologi nou-născuți și au găsit că mitozele observate în țesutul splenic al acestora în perioada următoare au fost limitate aproape în întregime la celulele de tipul gazdei. Concluzia acestor ultimi autori, conform căreia proliferarea celulară în splină în cursul reacției grefă-contra-gazdă la șoarece ține mai ales de celulele gazdei, este confirmată de Howard și colab. (299), care au inițiat la șoareci hibrizi nou-născuți această reacție prin injectarea celulelor splenice ale părinților adulți și au urmărit în cursul evoluției splenomegaliei, care însoțește reacția, pro-

Scanned with OKEN Scanner

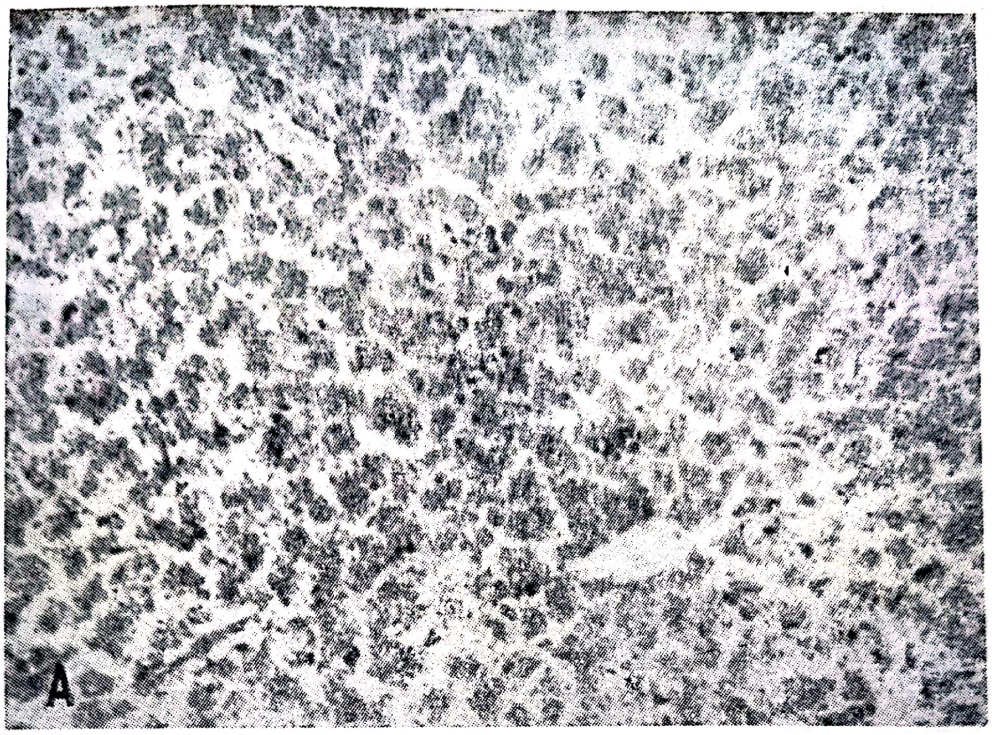


Fig. 32. — *A* — pulpă roşie splenică provenind de la un şoarece hibrid (A×C57BL) F1, după 6 zile de la iradierea întregului organism (800 r). Se observă reducerea masivă a populaţiei de celule nucleate şi aglomerarea de hematii;

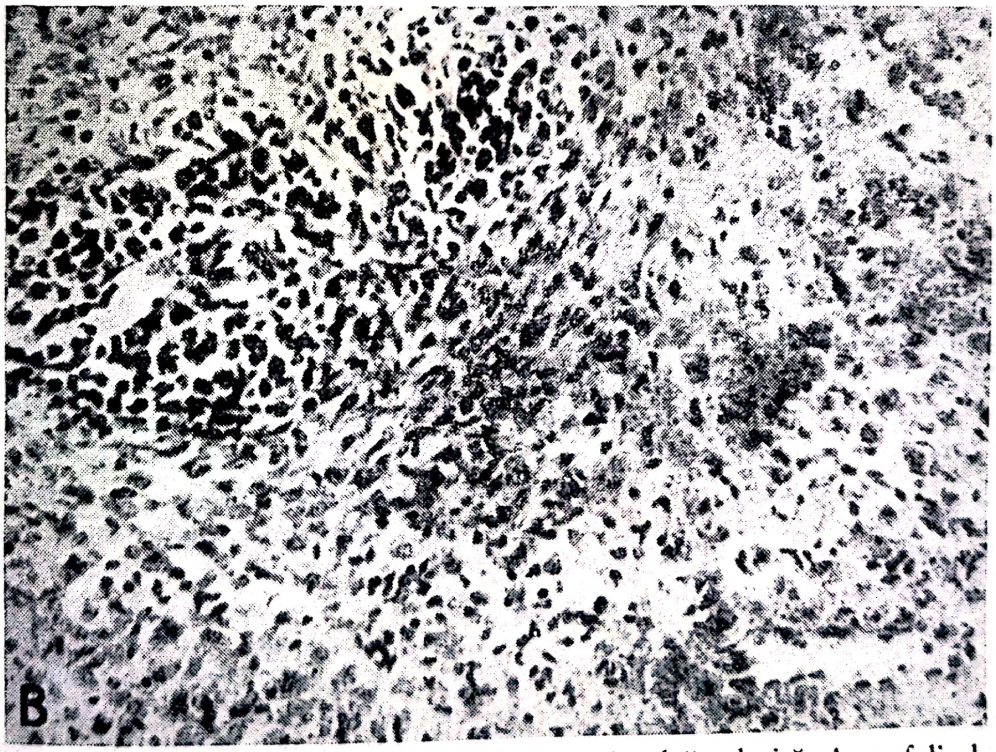


Fig. 32. — *B* — folicul malpighian din aceeaşi pulpă splenică. Acest folicul este mic, conţine focare de celule puternic colorate, iar reţeaua de celule reticuloendoteliale din pulpă este mai evidentă, ca urmare a reducerii densităţii celulare;

Scanned with OKEN Scanner

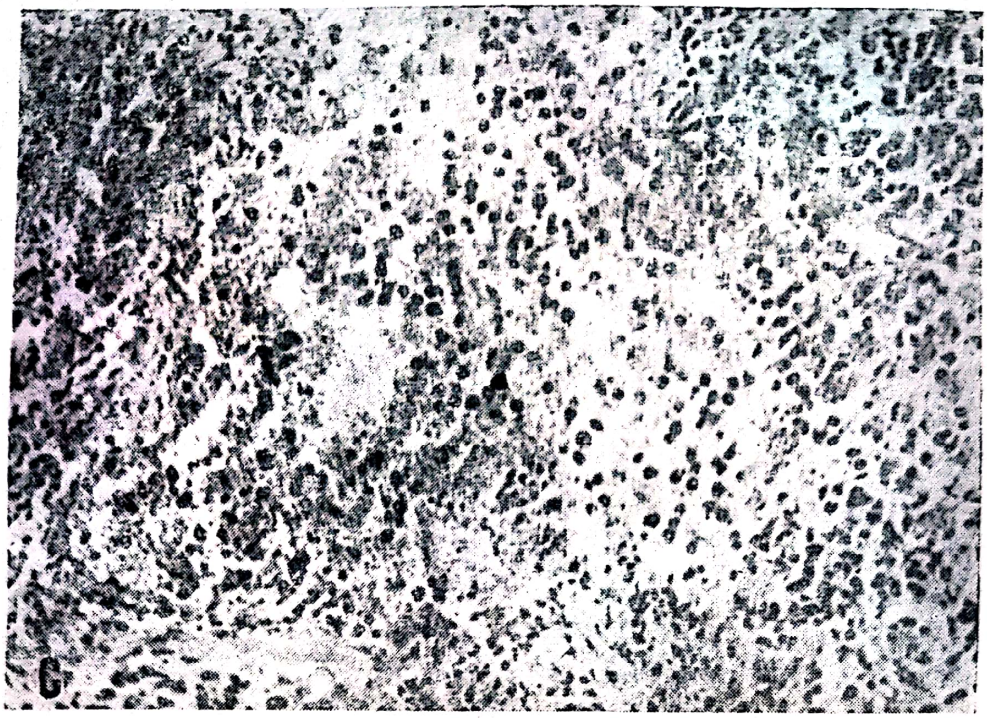


Fig. 32. — *C* — pulpă splenică provenind de la un şoarece hibrid (A×C57BL)F1 după 6 zile de la iradierea întregului organism (800 r), urmată de injectarea intravenoasă a ($8{,}4\times10^7$) celule splenice parentale A. Se observă că numeroase celule pironinofile infiltrează pulpa roşie splenică (verde de metilpironină, × 177) [după Howard şi colab. (299)].

porţia celulelor donatorului în totalul celulelor competente imunologic [folosind o metodă preconizată de Simonsen şi Jensen (551)]. La aceşti receptori nu s-a observat nici o activitate sau o activitate foarte slabă (numărul lor a fost de 14% din celulele competente imunologic din splină) din partea celulelor donatorilor în cursul unei perioade de 1—54 de zile după injectarea celulelor splenice de la părinţi. Cînd receptorul a fost iradiat în prealabil (600—800 r), celulele donatorului au fost detectate cu uşurinţă după 5 zile (fig. 32 *A*, *B*, *C*), ceea ce atestă faptul că proliferarea celulară din splină în cursul reacţiei grefă-contra-gazdă se face pe seama celulelor gazdei.

Reacţia pironinofilă puternică în splină şi în alte ţesuturi în care celulele grefate au putut ajunge, a fost considerată ca semnal direct al activităţii acestor celule (54, 545), dar această interpretare nu pare a fi validă în toate reacţiile grefă-contra-gazdă. Aşa cum s-a arătat mai sus, în cazul embrionului de găină, aproape 50% din celulele splenice în mitoză, detectate la 4 zile după grefare la un embrion de 14 zile, au fost originare de la donator (54). Situaţia este opusă la şoarece, la care s-a demonstrat că pironinofilia splenică se realizează pe seama proliferării celulelor gazdei (159).

Cercetările lui Howard şi colab. (292, 293) asupra naturii şi rolului celulelor pironinofile în reacţia grefă-contra-gazdă au o importanţă deosebită atît pentru cunoaşterea reacţiei pironinofile, cît şi pentru cunoaşterea activităţii fagocitare a organismului animalelor. Potrivit datelor acestor autori, creşterea

activității fagocitare începe la o săptămînă după injectarea celulelor și atinge intensitatea maximă după 10—12 zile. În această perioadă, splina prezintă o proliferare intensă a celulelor pironinofile, al căror număr se ridică la 50% din populația celulară totală. În ficat, însă, crește în mod deosebit numărul de celule reticuloendoteliale care mărginesc sinusoidele sale. Acest organ conține, de asemenea, focare de celule în proliferare, constînd din celule ale reticulului primitiv și celule pironinofile, clasificate ca plasmoblaști sau plasmocite imature. Prin metode de captare a carbonului coloidal sau de impregnare argentică, nu s-a semnalat și în splină proliferarea celulelor reticuloendoteliale. Aceste două organe prezintă, însă, diferențe de localizare a celulelor pironinofile și fagocitare.

Semnificația proliferării celulelor pironinofile nu a fost stabilită cu certitudine pentru eventualitatea că ea nu reprezintă o reacție a gazdei față de antigenul grefei. În acest caz, Simonsen (547) are în vedere două posibilități diferite:

a) Cea dintîi posibilitate ar fi că o parte substanțială a acestor celule nu sînt, de fapt, precursori plasmocitari, ci mai curînd fagocite, care sînt angajate în înlăturarea produselor de dezintegrare rezultate din atacul grefei-contra-gazdei. Karrer (319) și Kojima (328) pot fi citați în sprijinul acestui punct de vedere, dat fiind că au reușit că arate că celulele reticuloendoteliale angajate activ în fagocitoză prezintă semne de sinteză crescută a ARN, dar datele lui Howard (292) nu se aliniază observațiilor acestor autori, dat fiind că nu există paralelism între presupusa activitate fagocitară a acestor celule și captarea carbonului coloidal de către ele. Nu este însă exclusă posibilitatea ca resturile celulare rezultate din atacul grefei-contra-gazdei să angajeze sistemele locale de fagocitoză într-o asemenea măsură încît să afecteze capacitatea celulelor de a capta carbonul coloidal. Astfel s-ar explica faptul că celulele reticuloendoteliale localizate în altă parte, cum sînt acelea din sinusoidele hepatice, nefiind implicate în fagocitoză în aceeași măsură ca celulele reticuloendoteliale splenice, captează carbonul radioactiv din sînge într-un ritm mai mare.

b) Cea de a doua posibilitate ar fi ca reacția pironinofilă din splină să fie de fapt un răspuns plasmocitar, îndreptat împotriva unor agenți nespecifici pentru reacția grefă-contra-gazdă. Endotoxine bacteriene sau alte antigene ale mediului intestinal, care sînt în mod normal nenocive, posibil pentru că ar fi reținute de mucoasa intestinală, ar putea pătrunde în circulația sanguină, atunci cînd sistemul limfoid al gazdei se află sub atacul celulelor donatorului. Această ipoteză este sugerată de cercetările lui Howard (293), care au arătat că animalele cu sindrom de *runt* sînt de 25 de ori mai sensibile față de tipul I de endotoxină de *Shigella dysenteriae* decît animalele normale.

Anemia este mai ușor de evaluat decît modificările organelor limfoide din cursul reacțiilor grefă-contra-gazdă. Mitchison (424) a demonstrat prezența γ-globulinei de curcan la suprafața eritrocitelor embrionilor de găină cărora li s-au administrat celule de curcan competente imunologic. Lucrările lui Poster (485), efectuate pe iepuri, constituie însă dovada cea mai evidentă a naturii imunohemolitice a anemiei din reacțiile grefă-contra-gazdă. Astfel, acest autor a demonstrat că hematiile marcate cu ^{51}Cr ale receptorului se distrug în cursul reacției grefă-contra-gazdă într-un ritm mai accelerat decît

Scanned with OKEN Scanner

hematiile marcate provenind de la donator, că testul direct Coombs, cu eritrocitele receptorului, este pozitiv [fapt relevat şi de Simonsen (545) la găină] şi că se pot elua anticorpi specifici de pe aceste hematii. Anticorpii eluaţi reacţionează cu antigenele de grup sanguin, care sînt prezente la gazdă şi lipsesc la donator. Au fost publicate şi alte observaţii, concordante, rezultate din experienţe pe şoareci (465).

Toate datele prezentate demonstrează că celulele competente imunologic ale grefei pot induce formarea de anticorpi umorali la gazdă împotriva propriilor ei antigene. Există însă şi o evidenţă importantă privind formarea de anticorpi umorali împotriva celulelor donatorului la animalele cu reacţie grefă-contra-gazdă. Astfel, la şoareci iradiaţi cu doze letale de radiaţii, cărora li s-a transplantat măduvă osoasă străină şi la care incompatibilitatea tisulară a dus la declanşarea reacţiei grefă-contra-gazdă, s-a constatat că titrul hemaglutininelor antidonator creşte (175, 221, 608), dar nu se cunoaşte cu certitudine originea acestor hemaglutinine (609) şi nici implicaţiile lor în boala secundară (608).

Deşi măduva osoasă omologă poate fi transplantată cu succes la şoarecii iradiaţi cu doze letale de radiaţii (43, 330), proliferarea sa după transplantare poate fi abolită sau încetinită prin injectarea unor celule izologe competente imunologic (132, 135—236). Pe baza faptului că eritropoieza splenică este reflectată de captarea ^{59}Fe în acest organ (48, 95, 288), Willard şi Smith (633) au studiat gradul în care celulele izologe competente imunologic deprimă captarea splenică a ^{59}Fe şi au stabilit că există o ierarhizare a acestor celule, cu următoarea configuraţie în ordinea eficacităţii lor inhibitoare, asupra proliferării măduvei osoase: leucocite > celule ganglionare limfatice > celule splenice > celule din lichidul peritoneal. Timocitele şi celulele măduvei osoase nu au un asemenea efect, ceea ce înseamnă că în timus şi măduvă osoasă există puţine celule competente imunologic (71, 136, 367). Întrucîtva, aceste observaţii amintesc de cercetările lui Billingham şi Silvers (71), privind inducerea imunotoleranţei la şoarecii nou-născuţi, ale lui Santos şi Owens (512), privind producerea de anticorpi serici la şoarecii adulţi şi ale lui Perkins şi colab. (480), Cole şi Garver (132) şi Dixon şi colab. (172), privind formarea de anticorpi faţă de celulele lichidului peritoneal. Faţă de evidenţa considerabilă asupra producerii reacţiei grefă-contra-gazdă după transplantarea măduvei osoase, posibilitatea ca fixarea redusă a ^{59}Fe în splină, determinată de administrarea ulterioară transplantării măduvei osoase a unor celule competente imunologic să reprezinte un asemenea proces şi nu eliminarea măduvei osoase transplantate, reclamă şi investigaţii suplimentare şi comentarii. Intensitatea maximă a ambelor reacţii, eliminarea homografei de măduvă osoasă şi reacţia grefă-contra-gazdă se înregistrează la 7—8 zile (174, 633).

Leucocitele ocupă în aceste reacţii un loc important, dar rolul lor n-a fost suficient elucidat (112, 632); în cultură, imunocompetenţa lor se poate pierde în mare parte după 6 ore (556), dar nu se poate spune în ce măsură pierderea competenţei imunologice în cultură ar fi responsabilă de reducerea intensităţii bolii secundare, fapt observat de unii autori (13, 385), care au folosit pentru transplantare celule hematopoietice conservate o perioadă scurtă.

Aceste observaţii îndreptăţesc presupunerea lui Simonsen (547) că, din moment ce tipuri diverse de celule ale donatorului pot provoca reacţii grefă-

Scanned with OKEN Scanner

contra-gazdă, este raţional să se admită că şi alte tipuri de celule ale gazdei, altele decît eritrocitele, pot suferi acţiunea unor anticorpi umorali generaţi de existenţa celulelor grefate. Este dificil să se demonstreze direct această ipoteză, dar ea este compatibilă cu observaţia lui Siskind şi Thomas (554), care au găsit că anticorpii serici pot distruge grefele de celule competente imunologic sau aceea a lui Gorer şi Boyse (244), care au făcut constatări similare în privinţa distrugerii celulelor hematopoietice transplantate ca urmare acţiunii unor astfel de anticorpi. Se poate obiecta însă acestor autori că, de îndată ce au început tratamentul cu antiser aproximativ în acelaşi timp cu grefarea celulelor, acestea au fost mai accesibile anticorpilor circulanţi decît ar fi fost dacă antiserul s-ar fi administrat la un anumit interval de timp după pătrunderea celulelor grefate în ţesuturile gazdei. Dar această obiecţie este mai puţin validă pentru anticorpii umorali, care sînt formaţi de celulele grefate după ce ele au colonizat organele limfoide ale gazdei. Aceşti anticorpi trebuie să fie specifici mai curînd pentru celulele nucleate corespunzătoare ale gazdei (limfocit, histiocit, alte celule mezenchimatoase) decît pentru eritrocitele anucleate din sîngele circulant.

2. REZISTENŢA ANTIBACTERIANĂ ÎN REACŢIILE GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ

Reacţia grefă-contra-gazdă se produce, aşa cum s-a arătat, atunci cînd se introduc celule competente imunologic într-un organism străin, care, dintr-un motiv sau altul, nu este capabil să le elimine. La om, de exemplu, această situaţie poate să apară cînd sînt transplantate măduvă osoasă omologă sau celule splenice la un individ tratat cu radiaţii ionizante sau substanţe radiomimetice sau cu antimetaboliţi în doze suficiente pentru a împiedica eliminarea homografei celulare. Pentru a evita influenţa unor factori, cum ar fi iradiaţia, în stare să modifice cursul reacţiei grefă-contra-gazdă, Cooper şi Howard (141) au folosit pentru studiu receptori toleranţi din punct de vedere genetic faţă de celulele donatorului. Cînd hibrizii şoarecilor donatori şi receptori astfel selecţionaţi sînt injectaţi cu celule splenice sau limfoide, provenind de la ambele loturi iniţiale, se dezvoltă cu uşurinţă reacţia grefă-contra-gazdă, dat fiind că toate antigenele donatorului sînt prezente la receptor. Celulele donatorului atacă gazda, pentru că ea prin hibridare a căpătat antigenele respective. Pe asemenea modele experimentale s-a cercetat rezistenţa faţă de infecţii. La 2 săptămîni după administrarea parenterală a celulelor splenice de la părinţii descendentului hibrid, activitatea fagocitară a sistemului său reticuloendotelial este foarte intensă, după cum reiese din evoluţia *clearance*-ului carbonului coloidal din sînge (292), dar în acelaşi timp, susceptibilitatea sa faţă de endotoxinele bacteriene este crescută în mod exagerat (293), efect analog şi altor împrejurări în care sistemul reticuloendotelial a fost stimulat în prealabil. Mai mult, la şoarecii cu o reacţie severă grefă-contra-gazdă, formarea anticorpilor umorali faţă de antigenul H de *Salmonella typhi* este deprimată (300), iar în stadiile precoce ale acestei reacţii se constată o creştere a rezistenţei animalelor faţă de *Diplococcus pneumoniae* şi *Salmonella typhimurium* (141). În stadiile timpurii ale reacţiei, sistemul reticuloendotelial este hiperreactiv, în splină şi foliculii limfoizi găsindu-se o intensă proliferare celulară. Mai tîrziu, în cursul desfăşurării reacţiei grefă-

Scanned with OKEN Scanner

contra-gazdă, cînd organismul devine deficient în țesut limfoid, scade rezistența sa antibacteriană. Într-adevăr, Van Bekkum și colab. (46) au menționat cazuri cînd mortalitatea șoarecilor cu reacție severă grefă-contra-gazdă a putut fi redusă prin administrare continuă de antibiotice.

Cum protecția împotriva infecției pneumococice nu poate fi transferată prin plasmă sau ser, ea fiind condiționată direct de activitatea sistemului reticuloendotelial (141), s-ar putea presupune că factorii umorali nu au un rol major în rezistența antibacteriană, semnalată în fazele inițiale ale reacției grefă-contra-gazdă.

În mod paradoxal, deși șoarecele care prezintă o reacție grefă-contra-gazdă în faza inițială este mai rezistent la infecții cu anumiți germeni vii, el este hipersensibil la endotoxina pe care aceștia o conțin. O situație identică se întîlnește în cursul stimulării sistemului reticuloendotelial, provocată cu BCG sau alte specii de *Mycobacterium* (78, 297).

3. CĂILE DE ADMINISTRARE ȘI DISTRIBUȚIA CELULELOR LIMFOIDE ALE DONATORULUI ÎN ORGANISMUL GAZDEI

Unele antigene evocă răspunsuri foarte diferite cînd sînt administrate pe căi diferite. De exemplu, la un șoarece de 13 zile din linia genetică A, o serie de injecții intravenoase de celule splenice de la șoarecele hibrid $(CBA \times A)F_1$ induce toleranța la antigenele CBA, în timp ce administrarea intraperitoneală a aceluiași antigen, în aceeași doză, nu determină același răspuns (89, 258); un extract semisolubil din țesut limfatic de la un șoarece din linia genetică A sensibilizează șoarecele din linia C3H la grefele de piele provenind de la șoareci din linia A dacă este administrat intrapertioneal și nu are un asemenea rezultat dacă este administrat intravenos (399); în sfîrșit, la iepurii tineri, o serie de inoculări trisăptămînale de bacterii determină apariția unui titru de aglutinine de 10—15 ori mai mare cînd inocularea se face intraperitoneal, în comparație cu inoculările intravenoase ale unor doze similare de bacterii [Gowland și colab., citați de (28)].

Dat fiind că ^{51}Cr se atașează cu ușurință de celulele viabile (173, 235, 388, 451, 509, 513), că acest izotop este captat de toate celulele și, în special, de celulele active metabolic (610), că el rămîne atașat puternic de celule pînă cînd celulele mor (235, 509), că după eliberarea sa din celula moartă sau după eluție nu se reatașează *in vitro* la alte celule într-o cantitate apreciabilă (98) și că, deși el este un emițător slab de radiații γ, are suficientă energie pentru a putea fi detectat cu ajutorul unui analizor extern (388), Bainbridge și colab. (28) l-au folosit în urmărirea evoluției celulelor ganglionare limfatice alogeneice și singeneice, administrate la șoareci pe diverse căi. Cercetările acestor autori au demonstrat că atît în cazul celulelor ganglionare limfatice alogeneice (hibride), cît și în acela al celulelor ganglionare limfatice singeneice (de aceeași linie genetică), radioactivitatea evidențiată în diverse organe este de cîteva ori mai mare dacă aceste celule se administrează intravenos decît dacă se administrează intraperitoneal. Acest fapt este valabil pentru ficat, splină, plămîni și ganglionii limfatici și nu este valabil pentru timus și glandele salivare, în care s-a detectat o radioactivitate redusă, indiferent de

Scanned with OKEN Scanner

calea de administrare a celulelor. În cazul ambelor căi de administrare s-a dovedit că cea mai mare parte a izotopului se acumulează în ficat şi splină, iar dacă se face referire la greutatea organelor, captarea cea mai puternică a acestuia are loc în splină şi ganglionii limfatici. Aceste observaţii sugerează că distribuţia diferită a celulelor limfoide, administrate pe diverse căi, alături de faptul că celulele injectate intraperitoneal sînt expuse acţiunii macrofagelor peritoneale şi hepatice, determină rezultatele foarte diferite obţinute în tentativele de a induce starea de sensibilizare sau de toleranţă la receptor. Datele obţinute de Bainbridge şi colab. (28) asupra distribuţiei celulelor ganglionare limfatice în organele receptorului după administrarea intravenoasă nu sînt comparabile în mod strict cu alte studii cantitative făcute în acelaşi scop de către alţi autori (192, 199, 388, 436, 468, 535, 629). Făcînd abstracţie de diferenţele cantitative, distribuţia radioactivităţii în organele şoarecilor injectaţi pe cale intravenoasă cu celule ganglionare limfatice marcate cu ^{51}Cr, exprimată în procente din doza administrată (28), seamănă în general cu distribuţia leucocitelor leucemice marcate cu ^{51}Cr la om (388) şi cu distribuţia celulelor limfoide alogeneice marcate cu ^{32}P administrate la şobolani (629). Faptul că cea mai mare parte a dozei de izotop se stabileşte în splină şi ficat, probabil ca expresie a cumulării celulelor marcate vii, este în concordanţă cu observaţiile lui Osogoe (468) asupra acumulărilor limfoide focale care se produc în aceste organe după injectarea celulelor limfoide la iepuri şi cu observaţiile lui Mäkelä şi Mitchison (363), potrivit cărora activitatea celulelor ganglionare limfatice transferate la şoareci singeneici, iradiaţi, este foarte intensă în aceste organe. De asemenea, există similitudine între observaţiile lui Bainbridge şi colab. (28) şi acelea ale lui Farr (192) privind distribuţia celulelor ganglionare limfatice autologe marcate prin fluorescenţă şi administrate la iepuri şi între aceste observaţii şi acelea ale lui Murray şi Murray (436), care au studiat captarea celulelor limfoide de către ţesuturile limfoide la şoareci singeneici şi şobolani alogeneici iradiaţi, folosind limfocite timice marcate cu tritium. Fichtelius (199), administrînd limfocite marcate cu ^{32}P la şobolani singeneici, a constatat că cea mai mare capacitate de captare a acestor celule o are splina, dar datele sale privind capacitatea de captare a timusului şi a ganglionilor limfatici nu se pot pune de acord cu ale celorlalţi autori (28, 192, 436).

4. EVOLUŢIA CELULELOR TRANSPLANTATE ALE DONATORULUI ÎN REACŢIA GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ

Utilizînd marcajul cromozomic pentru a urmări evoluţia celulelor transplantate, Fox (211, 212) a arătat că în reacţiile grefă-contra-gazdă, induse la şoareci hibrizi $(CBA \times C57BL)F_1$ prin injectarea intravenoasă de 10^8 celule splenice parentale provenind de la fiecare dintre cele două genotipuri, se produce foarte rapid, la 2 zile după grefare, diviziunea şi acumularea celulelor donatorului în splina gazdei şi predominanţa mitozelor acestor celule în acest loc. Cînd se injectează celule splenice CBA, diviziunile celulelor donatorului se reduc treptat, pînă la proporţia de 1% după 13 zile de la grefare, acest nivel scăzut menţinîndu-se chiar după 60 de zile. În acest caz, aşa cum s-a arătat şi în altă secţiune a acestui capitol, splenomegalia, care atinge dimen-

Scanned with OKEN Scanner

siunile maxime la 13 zile de la grefare, pare a avea originea în reacţia gazdei şi nu în popularea splinei cu celulele donatorului. După o explozie precoce, similară, a activităţii celulelor donatorului în splina gazdei, care urmează administrării intravenoase de 10^8 celule splenice C57BL, nu se mai produce un declin comparabil aceluia observat după injectarea celulelor splenice CBA. Dimpotrivă, se înregistrează o continuă creştere a activităţii mitotice a celulelor donatorului, în aşa fel încît după 13 zile de la grefare, cînd splenomegalia este foarte marcată, toate mitozele s-au dovedit a fi de genotipul donatorului. Nu se înregistrează nici o mitoză a celulelor gazdei în următoarele 60 de zile după grefare. Majoritatea animalelor au activitate şi greutate normale, chiar dacă celulele donatorului rămîn reactive faţă de gazdă (214). Aceste fapte par a dovedi că diviziunea continuă a celulelor donatorului se poate datori persistenţei activităţii antireceptor a donatorului în cazul injectării celulelor splenice C57BL, în timp ce în combinaţia CBA→F_1, stimulul diviziunii celulelor donatorului este, probabil, consecinţa creşterii toleranţei gazdei faţă de celulele acestuia (45, 211).

Aceste fapte sugerează că este posibil ca factorul etiologic major în reacţia grefă-contra-gazdă să fie o depleţie limfoidă (360), ceea ce înseamnă că ar exista posibilitatea de a preveni sau întîrzia această reacţie prin simpla corectare a acestei depleţii. Depleţia celulelor limfoide sau a celulelor măduvei osoase poate duce la moarte prin lipsa de apărare împotriva unor infecţii intercurente în unele cazuri. Presupunerea că depleţia limfoidă este factorul major în patogenia reacţiei grefă-contra-gazdă este susţinută de date experimentale recente (36, 37, 359—361, 416, 477, 478), dar nu se cunoaşte modul în care se produce această depleţie. Dacă reacţia grefă-contra-gazdă este rezultatul depleţiei limfoide, potenţialul de recuperare depinde de rezerva de ţesut limfoid a receptorului şi de capacitatea de regenerare a acestui ţesut (201).

În cursul depleţiei limfoide şi al scăderii numărului de leucocite în sîngele periferic, modificări constante în reacţia grefă-contra-gazdă, se produce o pierdere rapidă în greutate. Recuperarea greutăţii este concomitentă cu creşterea numărului de leucocite în sînge şi reapariţia ţesutului limfoid în splină. O reacţie grefă-contra-gazdă gravă determină modificări distructive întinse, mai ales în foliculii limfatici, evidente chiar din primele 2—4 zile după injectarea celulelor competente imunologic la gazdă.

Administrarea ţesutului limfoid presensibilizat împotriva gazdei declanşează de obicei o boală secundară accelerată la combinaţiile hibride F_1 (306, 527), mortalitatea menţinîndu-se crescută chiar la receptorii hibrizi F_1 iradiaţi cu doze subletale de radiaţii (131, 292, 527).

Curînd după primul lor contact cu antigenele gazdei, celulele limfoide transplantate sînt sensibilizate şi încep să prolifereze. S-a afirmat, fără a se fi demonstrat suficient, că celulele reactive imunologic sînt susceptibile de a muri în cursul reacţiei cu antigenul şi s-a desemnat acest fenomen cu termenul de „moarte alergică“ (138, 244). În această eventualitate, este de presupus că, după o explozie mitotică iniţială, urmează o diminuare a activităţii celulelor donatorului, dar faptul că deseori se înregistrează în organismul gazdei o diviziune marcată şi prelungită a celulelor donatorului (132, 212 — 214, 382, 548) ilustrează punctul de vedere, menţionat mai sus, potrivit căruia scăderea

Scanned with OKEN Scanner

activității celulelor donatorului, atunci cînd se produce, este determinată de instituirea la gazdă a unei stări de toleranță față de celulele acestuia.

Cantitatea mare de antigen cu care celulele reactive imunologic transplantate vin în contact, le stimulează inițial, iar ulterior provoacă paralizia imunologică (137). Celulele presensibilizate își păstrează independența imunologică pentru o perioadă mai lungă de timp, în care ele continuă să fie stimulate de către antigenele gazdei. De îndată ce starea de toleranță s-a instituit, este probabil ca celulele donatorului să treacă sub controlul homeostatic normal al factorilor de codificare a țesutului respectiv al receptorului (133) și, în consecință, să se dividă în ritmul constant în care se divid celulele gazdei.

5. RELAȚIILE GENETICE DINTRE REACȚIA DE ELIMINARE A GREFEI ȘI REACȚIA GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ

Interpretînd genetic datele lui Murray și colab. (435) asupra evoluției rinichilor transplantați la om, redate în tabelul 1, Simonsen (550) a stabilit cîteva concluzii privind supraviețuirea unei homografe și anume: a) supraviețuirea homografei este dominată în primul an de un *locus* cu trei sau poate chiar patru alele puternice; b) absența reacției grefă-contra-gazdă este suficientă în această perioadă, pentru a asigura supraviețuirea grefei; c) supraviețuirea grefei peste 1 an diminuează progresiv din cauza inhibiției alogeneice, provocată de aceleași alele puternice, îngăduită fiind în această perioadă, eventual, supraviețuirea grefelor singeneice; d) un asemenea *locus* poate conține alele adiționale de forță mai redusă, care pot înfrunta imunosupresiunea artificială, dacă grefa este dublu incompatibilă și, în consecință, pot deveni ele însile dominante în reacțiile de grefare ale unor țesuturi de la donatori neînrudiți din punct de vedere genetic.

6. ROLUL TIMUSULUI ÎN REACȚIA GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ

Miller și Dukov (419) au prezentat într-o lucrare amplă numeroase date care arată că, la mamifere, timusul joacă un rol important în dezvoltarea capacității imunologice a organismului. Asupra acestui fapt s-au prezentat anterior numeroase date. Cu această ocazie se reamintesc numai cîteva dintre ele. Cobaii (200), iepurii (23) și șoarecii (378) timectomizați în primele luni de viață produc anticorpi circulanți într-o măsură evident mai mică decît animalele de control, iar timectomia efectuată în cursul perioadei neonatale afectează dezvoltarea sistemului limfoid (418, 478) și limitează capacitatea animalelor de a elimina homotransplantul de piele (380, 412) sau de țesut tumoral (379). La animalele adulte, timectomia reduce sistemul limfatic în mod considerabil (420), iar dacă într-o asemenea situație animalele sînt și puternic iradiate, țesutul limfoid este incapabil să se regenereze (228, 420).

Datele lui Dalmasso și colab. (154, 156) arată că celulele splenice aparținînd unor șoareci adulți timectomizați la scurt timp după naștere nu mai pot produce reacțiile grefă-contra-gazdă, evidențiabile prin tehnica de histocompatibilitate a lui Simonsen (547); iar cercetările lui Martinez și colab. (378) demonstrează că timectomia, efectuată mai tîrziu de 40 de zile de la

Scanned with OKEN Scanner

naştere, favorizează apariţia şi exagerează intensitatea tulburărilor imunologice produse de administrarea limfocitelor omologe normale. Această observaţie este explicată prin scăderea numărului celulelor limforeticulare la şoarecele timectomizat, ceea ce înlesneşte atacul imunologic al celulelor splenice adulte omologe (378). Această explicaţie găseşte sprijin în lucrările lui Fichtelius (200) privind distribuţia în ţesuturile limfoide periferice, cum ar fi splina, a celulelor timice injectate, în observaţiile lui Papermaster şi colab. (473), potrivit cărora supresiunea hormonală a dezvoltării bursei Fabricius la păsările tinere favorizează reacţiile grefă-contra-gazdă după transplantarea celulelor splenice de pasăre adultă şi în lucrările lui Miller (414) şi Parrott şi East (476—478), care au arătat că şoarecii timectomizaţi la naştere sînt susceptibili de a face sindromul de *runt* la injectarea de celule omologe, dacă animalele receptoare au atins vîrsta de 2 săptămîni, în timp ce şoarecii de control, netimectomizaţi, nu fac asemenea tulburări.

Timectomia măreşte de asemenea susceptibilitatea şobolanilor hibrizi F_1 faţă de reacţia grefă-contra-gazdă, indusă prin administrarea intraperitoneală a celulelor splenice parentale (202), proporţia recuperărilor de animale fiind condiţionată de doza de celule alogeneice folosită (45, 202). Aceeaşi stare se realizează şi prin iradiere cu doze letale sau subletale de raze Röntgen, urmată de transfuzia de măduvă osoasă singeneică (3, 232). Timectomia şi iradierea îşi sumează acest efect (201).

Goebloed şi Vos (231) au investigat influenţa timectomiei gazdei şi a donatorului asupra incidenţei şi a duratei de supravieţuire după realizarea unui himerism celular postiradiaţie şi au constatat că, în această condiţie, timectomia este urmată numai de o uşoară prelungire a timpului de supravieţuire a animalelor. Moartea prin boala secundară nu poate fi diferenţiată în acest caz de efectul fatal al timectomiei. De altfel, în afara proceselor imunologice caracteristice reacţiilor grefă-contra-gazdă au fost de asemenea incriminate ca factori patogenici în himerismul celular alogeneic postiradiaţie, atrofia ţesutului limfatic (36), leziunile tardive provocate de iradiere (46) şi infecţia (47). Efectele tardive ale iradierii explică moartea animalelor timectomizate la care s-a realizat un himerism celular singeneic postiradiaţie (178, 230, 489). Deoarece semnele clinice şi morfologice în himerismul celular singeneic la animalele timectomizate sînt asemănătoare acelora din himerismul celular alogeneic la animalele normale, este foarte dificil să se stabilească precis cota de participare a timectomiei la producerea lor. Pe baza datelor lui van Putten (489) se poate afirma că timectomia poate precipita moartea animalelor care au trecut printr-o reacţie grefă-contra-gazdă. Scăderea uşoară a mortalităţii, semnalată uneori după administrarea măduvei hematogene la şoarecii timectomizaţi, ar putea fi explicată prin numărul redus de celule limfoide competente imunologic din inoculul medular. Această presupunere concordă cu datele lui Amiel şi Mathé (12) şi ale lui van Bekkum (44), care au obţinut o descreştere a mortalităţii după administrarea măduvei hematogene alogeneice prin eliminarea selectivă a celulelor competente imunologic din suspensiile celulare respective (suspensiile celulare fiind plasate cîteva ore la +37° sau cîteva zile la +4°).

Un fapt interesant este acela semnalat de Vos şi colab. (612) şi Goebloed şi Vos (231), care au constatat o mortalitate ridicată în reacţiile grefă-contra-

Scanned with OKEN Scanner

gazdă la şoareci, dacă au fost trataţi cu măduvă hematogenă alogeneică provenită de la animale cu himerism celular îndelungat, realizat cu ţesut limfoid de la un donator tolerant faţă de antigenele gazdei. Această observaţie nu este concordantă însă cu datele lui Ford şi colab. (209), care au constatat că mortalitatea este redusă după tratament cu măduvă hematogenă alogeneică de la animale cu himerism celular de lungă durată. Koller şi Doak (331) nu au semnalat nici o reducere a mortalităţii după primul transfer de asemenea celule, dar au demonstrat că ea se reduce după al doilea transfer.

Celulele care repopulează sistemul limfoid după iradiere se trag în primul rînd din celulele măduvei hematogene (210) şi din celulele timice care deţin de asemenea o cotă importantă (647). În stadiile precoce de recuperare celulară postiradiaţie (prezenţa timusului fiind necesară), unele celule hematogene medulare alogeneice par a deveni competente imunologic, fără a avea o toleranţă specifică dobîndită faţă de ţesuturile receptorului (231), ceea ce ar putea duce la reacţia grefă-contra-gazdă. Dacă într-o asemenea împrejurare animalele supravieţuiesc celulele reactive ar putea fi, eventual, înlocuite cu populaţii celulare mai tolerante (34, 130, 168, 306, 482, 511, 647). Este de la sine înţeles că, dacă se injectează celule limfoide tolerante, ele repopulează ţesuturile limfoide ale gazdei de la început. Nefiind necesară dezvoltarea celulelor competente imunologic din celulele nediferenţiate din măduva hematogenă, riscul apariţiei unei reacţii grefă-contra-gazdă este înlăturat.

7. REACŢII GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ CU CARACTER SPECIAL

a) **Criza hemolitică după transplantarea ficatului.** Transferurile de ţesuturi între indivizi de grupe sanguine compatibile dar diferite se pot face fără risc numai în cazul anumitor ţesuturi. De exemplu, direcţia de transfer de ţesuturi de la o grupă O la grupa A, o „incompatibilitate" care s-a dovedit a fi relativ nevătămătoare în efectuarea transplantării rinichiului, dat fiind că homografa nu este pusă în contact cu hemaglutinine preformate ale gazdei (568—570). În ceea ce priveşte însă homotransplantul de ficat, o asemenea abatere de la compatibilitatea de grup sanguin poate fi mai puţin nenocivă, dat fiind că ficatul posedă o activitate eritroclastică (308) şi poate acţiona împotriva hematiilor receptorului. În aceste circumstanţe s-ar produce, aşadar, o reacţie grefă-contra-gazdă, care s-ar manifesta ca o criză hemolitică.

b) **Reacţia grefă-contra-gazdă în stadiile embrionare.** Acest tip de reacţie a fost studiat de Simonsen (549) pe embrioni de găină, care în acest context au o calitate deosebită: accesibilitatea membranei corioalantoide. Aceasta oferă, pe de o parte, o cale intravenoasă, care permite folosirea modificărilor de volum ale splinei ca indicator, iar pe de altă parte, suprafaţa sa, care poate servi ca o placă de însămînţare *in vivo* a celulelor competente imunologic, făcînd în acelaşi timp posibilă urmărirea evoluţiei leziunilor.

Sistemul de studii pe membrana corioalantoidă a fost imaginat de Burnet (102) ca o posibilitate de verificare a ipotezei sale asupra selecţiei clonale. El a susţinut că fiecare leziune care se dezvoltă pe membrana corioalantoidă pentru aproximativ 10^3 limfocite mari care au fost însămînţate provine, de fapt, dintr-o singură celulă competentă imunologic. Evidenţa lor în sprijinul

Scanned with OKEN Scanner

acestei ipoteze (cunoscută sub numele de ipoteza „țintei unice") (102) nu este totuși suficient de convingătoare. Confirmarea completă a postulatului lui Burnet asupra relației o celulă — o leziune a fost făcută de Coppleson și Michie [citați de (549)], cu ocazia unei reinvestigații critice a acestui postulat. Ei au constatat că între logaritmul numărului de leziuni și acela al dozei de celule grefate există o relație liniară și au considerat că linia de regresiune ar trebui să aibă o pantă egală cu 1, dacă ipoteza ar fi corectă, sau o pantă egală cu *n*, dacă ar avea loc *n* fenomene în loc de unul singur. După considerabile dificultăți, acești autori au perfecționat o tehnică de lucru și au obținut cu ajutorul ei o familie de pante din cinci experiențe independente, care au variat de la 0,79 la 1,21, cu o medie de 0,98.

Genele de histocompatibilitate și reacția grefă-contra-gazdă au constituit, de asemenea, preocuparea unor cercetători (93, 224, 225, 310, 532, 534). Numărul de *loci* responsabili de grup sanguin la păsări a fost stabilit în prezent la cel puțin 10 (93, 224). Printre acești *loci* (desemnați cu A, B, C etc.), unul, *locus*-ul B, pare a ocupa o poziție unică, oarecum asemănătoare cu *locus*-ul H-2 la șoarece.

Locus-ul B (sau probabil un alt locus foarte înrudit cu acesta) controlează în mod strict antigenele de histocompatibilitate, după cum s-a putut demonstra prin grefarea pielii la păsări din rasa albă Leghorn din linii genetice a căror selecție s-a făcut pe baza a patru *loci* diferiți de grup sanguin (532). Aceeași autori (534) au constatat mai tîrziu că *locus*-ul C poate condiționa unele dintre antigenele slabe de transplantare; nu s-a găsit nici o corelație între alți *loci* de grup sanguin și histocompatibilitate. Importanța *locus*-ului B pentru homografarea pielii a fost confirmată de mulți alți autori (146, 148, 225, 227).

În timp ce eliminarea grefei de piele poate fi determinată de antigene slabe, controlate de un număr necunoscut de *loci* neidentificați, reacția grefă-contra-gazdă, apreciată prin evoluția splenomegaliei, poate fi determinată de *locus*-ul B singur (225, 310, 533). Deși ultima relatare ar trebui completată cu specificarea că se referă la folosirea unor donatori preimunizați specific, adică la fel cum a lucrat Simonsen (548) pe șoareci, nu este nici o îndoială că pentru donatorii normali, *locus*-ul B are o importanță crescută pentru dezvoltarea reacțiilor grefă-contra-gazdă. Numărul de diferite alele B este fără îndoială foarte mare, probabil cel puțin 50 [McDermid, citat de (549)].

Este bine stabilit că la numeroase specii animale, cel puțin unele dintre limfocitele circulante mici sînt celule competente din punct de vedere imunologic (252). Totuși, la păsările de curte, Szenberg și Warner (588) au constatat cu ajutorul tehnicii membranei corioalantoide că numărul de leziuni se corelează cu numărul de limfocite mari, în timp ce cu cele mici nu s-a constatat nici o corelație. Solomon (563) a publicat date preliminarii, care contestă această observație. El a izolat în suspensie limfocite sanguine mici de la păsări de curte, cu ajutorul filtrării prin bile de sticlă. Limfocitele mici obținute au fost în mod evident necontaminate cu limfocite mari (ci numai cu puține bazofile) și totuși ele au produs splenomegalie la embrionii-gazde. Sînt, însă, necesare cercetări suplimentare pentru a putea considera închisă această problemă.

Scanned with OKEN Scanner

Ipoteza selecţiei clonale a fost prezentată într-un capitol anterior; de aceea, aici, nu se insistă asupra ei. Menţionăm numai că atunci cînd această ipoteză a început să fie testată prin tehnicile grefă-contra-gazdă, s-a ajuns la o serie de dificultăţi (100). În lumina unor rezultate recente, numeroase argumente, dintre cele mai puternice, împotriva acestei teorii, şi-au pierdut valoarea. Două asemenea argumente s-au bazat pe observaţii pe care le relatăm şi cu această ocazie:

a) Szenberg şi Warner (588), care au socotit că limfocitele mari sînt competente imunologic în sîngele păsărilor, au constatat de asemenea că numărul de limfocite din unele leziuni produse pe membrana corioalantoidă a fost cam de 40. Chiar dacă numai una dintre cele 40 de celule a fost iniţiatorul actual al leziunii, ar fi nerezonabil să se afirme că tot aşa de puţine celule s-au interferat cu restul universului imunologic.

b) Burnet şi Burnet (104) au găsit că inocularea unor celule competente imunologic de la păsări din aceeaşi linie genetică (AA) ar produce la fel de multe leziuni pe membrana corioalantoidă a unui hibrid F_1 (AB), care s-a presupus că diferă de donatorul respectiv numai în privinţa unui antigen major, ca şi inocularea pe această membrană a unor celule competente imunologic de la păsări fără legătură genetică, care s-a presupus că prezintă diferenţe antigenice în limite largi.

Aceste observaţii au fost folosite în detrimentul ipotezei selecţiei clonale, dar acum nu mai au aceeaşi greutate. Dacă antigenele *locus*-ului B deţin în mod virtual monopolul în producerea leziunilor reacţiei grefă-contra-gazdă (cînd s-au folosit donatori normali), atunci numărul de antigene puternice care pot fi active în oricare combinaţie donator-receptor este de numai 1—2. Problema care se pune în această situaţie este dacă două alele B străine vor produce mai mult decît o singură leziune.

Versiunea originală a ipotezei selecţiei clonale este greu de conciliat cu observaţia lui Simonsen (548), la şoarece, la care preimunizarea specifică a donatorului are efect cu atît mai mic, cu cît antigenul este mai puternic, ceea ce reclamă verificarea suplimentară a acestei ipoteze (549). Prin folosirea unei combinaţii genetice care exclude aproape cu certitudine antigenele puternice la gazdă, dar include un număr necunoscut de antigene slabe la receptor, absente la donator, Warner şi Szenberg (624) au demonstrat în mod clar că după imunizarea specifică a donatorului, activitatea celulelor grefate creşte de şapte ori. Această observaţie este în contrast cu observaţii anterioare ale aceloraşi autori (356), în care au fost implicate antigene puternice (probabil de *locus* B), fără să se fi înregistrat vreo creştere de activitate consecutivă imunizării donatorilor.

Dezvoltarea cu vîrsta a celulelor competente imunologic la păsări a fost obiectul unor lucrări ample (562, 563), care au stabilit că aceste celule apar în sîngele periferic foarte precoce (la cîteva zile după ce embrionul s-a constituit). De altfel, sugestia că embrionii de găină prezintă un oarecare grad de competenţă imunologică a fost făcută încă din 1914, de către Murphy [citat de (549)]. La 13—15 zile, aceşti embrioni sînt în stare de un răspuns imun activ (298, 563). Doza de celule antigenice care permite să se demonstreze răspunsul imun la embrion este însă mult mai mică decît doza necesară pentru a pune în evidenţă o reacţie grefă-contra-gazdă. Doza de celule care

Scanned with OKEN Scanner

poate produce leziunile reacţiei grefă-contra-gazdă anulează şi răspunsul imun al gazdei embrionare. Acest fapt pare plauzibil mai ales pentru stadiul embrionar de la 13—14 zile, cînd splenomegalia produsă prin celule competente imunologic este mai pronunţată decît aceea produsă la embrioni de mai multe zile sau la puii foarte tineri. Faptul că embrionii mai avansaţi par mai puţin susceptibili pentru leziunile provocate de reacţia grefă-contra-gazdă poate fi determinat de maturarea spontană şi progresivă a răspunsului imun embrionar (307, 564). Această afirmaţie rămîne însă slab fondată dacă nu se poate demonstra că nu este valabilă pentru ouăle de hibrizi F_1 injectate ca celule parentale. Dacă şi aceşti din urmă embrioni sînt de asemenea mai susceptibili de a face reacţia grefă-contra-gazdă la 13—15 zile decît atunci cînd au mai multe zile, atunci trebuie să se găsească o altă explicaţie acestui fenomen. Demonstrarea kariologică a multiplicării celulelor gazdei în leziunile reacţiei grefă-contra-gazdă, de care s-a făcut uz frecvent, este prezentată uneori ca argument pentru reacţia gazdă-contra-grefă (463). Natura multiplicării celulelor gazdei în cursul reacţiei grefă-contra-gazdă rămîne o problemă încă nerezolvată, dar se cunoaşte faptul că gradul în care celulele grefei se multiplică în organismul gazdei variază de la o combinaţie genetică la alta (214).

Posibilitatea de a transfera în serie splenomegalia din reacţia grefă-contra-gazdă a fost pusă iniţial pe seama propagării celulelor în diviziune rapidă ale donatorului. S-a considerat de asemenea că nu se produce un declin apreciabil în activitatea acestor celule într-o perioadă de peste nouă transferuri săptămînale succesive (545); dar asupra acestei observaţii nu există un acord larg, dat fiind că alţi cercetători (103, 471) n-au reuşit să realizeze un număr la fel de mare de astfel de transferuri.

După părerea lui Burnet şi Boyer (102, 103), celulele competente imunologic îşi pot pierde toleranţa lor „naturală" fie prin exercitarea unui stimul antigenic repetat şi intens, chiar de scurtă durată, fie prin proliferare; dar Simonsen (549) şi Warner (625) consideră că această pierdere a toleranţei este numai aparentă şi că, probabil, ea nu este altceva decît o reacţie la homografă, care se continuă după transferul celular la o gazdă inertă.

c) **Boala parabiotică.** Cînd două animale incompatibile genetic sînt plasate în parabioză, unul dintre parteneri este afectat uneori de o serie de tulburări (pierdere în greutate, diaree, anemie, atrofie limfoidă generală şi suprimarea proceselor imunologice), care duc la moarte şi au fost desemnate cu termenul de *boală parabiotică*. De îndată ce simptomele au apărut, de obicei în cursul celei de a 2-a săptămîni după operaţie, moartea animalului se produce în cîteva ore sau zile.

Deşi boala parabiotică este cunoscută din 1909 [Ranzi şi Erlich, citaţi de (448)], etiopatogenia sa a rămas încă obscură. Finerty şi Panos (204) au atribuit-o incompatibilităţii funcţionale între parteneri. Nakić şi Silobrcić (445) au demonstrat că între apariţia acestui sindrom la unul dintre parabionţi şi incapacitatea sa de a elimina o homografă de piele provenind de la partenerul său parabiotic este o relaţie strînsă. Simptomele bolii apar totdeauna la parabiontul care poartă o grefă încrucişată de piele viabilă şi persistă atît timp cît gazda este incapabilă să o elimine (446). Această strînsă relaţie dintre supravieţuirea homografei încrucişate de piele şi apariţia bolii şi asemănarea tabloului său clinico-patologic cu acela al bolii secundare sau al sindro-

Scanned with OKEN Scanner

mului de *runt* au determinat pe Nakić şi colab. (442—447) să o considere ca o reacţie grefă-contra-gazdă; sau, cu alte cuvinte, condiţia rezultată din transferul celulelor competente imunologic prin tuburile de anastomoză vasculară între parabionţi şi competiţia consecutivă, între celulele imunizate ale donatorului şi acelea ale gazdei, care de obicei determină leziuni ale ţesuturilor limfoide ale ambilor parteneri. În unele combinaţii donator-gazdă, condiţiile antigenice creează însă diferenţe importante în reactivitatea imunologică a partenerilor în parabioză; partenerul cel mai reactiv distruge ţesuturile limfoide ale partenerului mai slab şi le înlocuieşte cu propriul său ţesut limfoid. Himerismul celular asimetric, evidenţiat în perechile de parabionţi în care la un partener se dezvoltă boala parabiotică, sprijină puternic ipoteza că factorul principal responsabil de declanşarea şi întreţinerea ei este diferenţa de reactivitate imunologică dintre parteneri. Faptul că într-o anumită combinaţie de linii genetice în parabioză, boala se manifestă la partenerul dintr-o anumită linie genetică şi nu la celălalt partener sugerează de asemenea că inducţia sa se află sub un strict control genetic. Importanţa direcţiei stimulului antigenic în producerea bolii parabiotice a fost subliniată de Eichwald şi colab. (186). Direcţia inducerii bolii parabiotice letale poate fi schimbată în mod artificial. De exemplu, Kastelan [citat de (448)] a reuşit să efectueze această schimbare prin timectomia neonatală a partenerului celui mai puternic dintr-o combinaţie parabiotică. Rămîne de văzut dacă diferenţa de reactivitate imunologică a partenerilor se datoreşte numai diferenţelor de dotare antigenică din combinaţia donator-receptor, aşa cum s-a presupus la un moment dat (442, 443).

De asemenea, observaţia conform căreia la perechile de parabionţi la care nici unul dintre ei nu manifestă simptomele acestei boli se poate evidenţia un himerism celular simetric, justifică presupunerea că transferul celulelor sanguine competente imunologic de la un partener la altul este iniţial aproximativ egal. Astfel, himerismul asimetric şi simptomele bolii parabiotice s-ar dezvolta secundar competiţiei dintre populaţiile celulare ale donatorului şi receptorului, aşa cum sugerează teoria substituirii celulare competitive (448). Prezenţa atrofiei formaţiunilor limfoide la ambii parteneri în parabioză este în concordanţă cu această ipoteză, care este susţinută de asemenea şi de observaţiile lui Leonard şi Albright (354) şi ale lui Walford şi Hildemann (618). Afirmaţia lui Nakić (442) că boala parabiotică letală ilustrează gradul cel mai înalt al unei stări de toleranţă imunologică nu se încadrează în observaţiile recente, menţionate mai sus. Potrivit teoriei substituţiei celulare competitive o reacţie letală grefă-contra-gazdă ar trebui să fie însoţită de o valoare mare a raportului dintre celulele donatorului şi celulele gazdei, adică celulele donatorului ar trebui să predomine în populaţia celulelor limfoide ale partenerului afectat de boală. Totuşi, analiza citologică a şoarecilor parabionţi care au făcut boala parabiotică, a arătat că majoritatea celulelor din splină şi ganglionii limfatici aparţin gazdei.

Procente scăzute de celule provenind de la donator au fost găsite în splină şi la şoareci care au manifestat o altă formă de reacţie grefă-contra-gazdă şi anume, sindromul de *runt*. Davies şi Doak (159), folosind şoareci cu cromozom T6 ca mijloc de marcare, a găsit că splenomegalia la animalele tinere, injectate la naştere cu celule splenice omologe de la animalele adulte, nu se

Scanned with OKEN Scanner

datorește proliferării celulelor donatorului, dar alți cercetători (211—214, 382) au prezentat date contrarii acestei observații.

Față de cele de mai sus, în dezvoltarea bolii parabiotice trebuie să se aibă în vedere două fenomene separate, și anume: (*a*) interacțiunea dintre populațiile celulare în competiție ale celor doi parteneri, care duce la (*b*) atrofia țesuturilor limfatice. Atrofia acestor țesuturi este cauza imediată a apariției sindromului clinic și, eventual, a morții animalelor. Acestei atrofii limfoide i se alătură o anemie secundară (185, 445), provocată probabil, prin hemoliză imună (484).

d) **Boala omologă (boala alogeneică acută).** Acest sindrom, provocat la șoareci prin injectarea intraperitoneală a unor celule peritoneale sau a unor celule limfoide imunizate specific, provenind de la un animal din altă linie genetică, a fost descris de numeroși autori (58, 548, 630); boala are o evoluție fatală, rapidă (de numai 32—40 de ore) și se caracterizează prin peritonită generalizată, necroză extensivă a pancreasului, necroză în focare a țesutului adipos peritoneal, diaree, deshidratare extremă, dilatație intestinală, ascită și hemoconcentrație, adică semnele evidente ale unei reacții grefă-contra-gazdă. Deși cauza imediată a morții animalelor pare să fie deshidratarea și reducerea volumului de sînge circulant, încercările de a se corecta aceste tulburări au rămas fără efect. Granger și colab. (259) consideră că enzimele eliberate din pancreasul necrozat ar contribui într-o mai mare măsură la alterarea stării animalelor. Acești autori au folosit ca model experimental șoareci parabionți (cu anastomoză vasculară și/sau coeleoanastomoză) din linii genetice diferite (A/Jax și C57BL/Ks) (unul dintre ei fiind injectat intraperitoneal cu celule peritoneale imune de la un animal din linia genetică a partenerului său, dacă nu s-au aflat în coeleoanastomoză). Cercetările efectuate pe acest model experimental au condus la concluzia că în patogenia bolii omologe nu poate fi implicat un factor toxic și că sindromul este provocat de fenomene imunologice legate de transferul celular, moartea datorîndu-se, în primul rînd, efectelor circulatorii. Această concluzie este sprijinită de următoarele observații: *a*) nu s-au detectat anticorpi umorali la cei doi parabionți și nici chiar la receptorul de celule imunizate; *b*) în cazul parabionților cu circulație încrucișată și fără coeleoanastomoză a făcut boala numai partenerul căruia i s-au inoculat celule imunizate; *c*) în cazul parabionților cu coeleoanastomoză și fără circulație încrucișată a murit partenerul care a primit celule imune alogeneice. Aceste observații completează rezultatele unor cercetări anterioare ale acelorași autori (630).

8. TENTATIVELE DE PREVENIRE SAU SUPRIMARE A REACȚIEI GREFĂ-CONTRA-GAZDĂ ȘI SEMNIFICAȚIILE EFECTELOR LOR

Metodele care pot fi folosite pentru a preveni, reduce sau suprima o reacție grefă-contra-gazdă pot fi clasificate în patru grupe mari: a) selecția combinațiilor donator-receptor în așa fel, încît diferențele de histocompatibilitate să fie minime; b) administrarea unor populații de celule ale donatorului cu un conținut scăzut de celule imunologic competente; c) înlocuirea țesutului limfoid al gazdei prin administrarea preliminară a unor doze de celule lim-

Scanned with OKEN Scanner

foide de la donator și d) distrugerea sau suprimarea celulelor donatorului prezente în gazdă în momentul iminenței reacției.

Succesul acestor metode sprijină concepția de bază asupra reacției grefă-contra-gazdă, potrivit căreia ea reprezintă atacul celulelor competente imunologic ale grefei, lansat asupra antigenelor primitorului și, în special, asupra antigenelor sistemului limfoid.

Prima metodă de prevenire a reacției grefă-contra-gazdă depinde de condiții imunogenetice [de exemplu, grefa trebuie să primească un stimul antigenic adecvat de la gazdă, în timp ce gazda trebuie să reacționeze slab sau să nu reacționeze de loc la grefă (548)]. Acesta este motivul pentru care celule splenice ale hibrizilor F_1 nu pot provoca reacția grefă-contra-gazdă la tulpinile parentale (58). Faptul că boala omologă este absentă sau ea are manifestări minime dacă se iradiază cu raze Röntgen receptorii de celule de măduvă osoasă prelevate de la donatori cu aceiași *loci* majori de histocompatibilitate (604) este de asemenea un argument în sprijinul acestui principiu.

A doua metodă generală, inocularea unei suspensii celulare săracă în celule competente imunologic, a fost încercată în numeroase împrejurări, constînd în efectuarea timectomiei neonatale a donatorului (154), agenți limfolitici, ca azotiperita sau cortizonul (11) și iradierea cu raze Röntgen (149, 542). Michie și colab. (407) au arătat că, făcînd viitorul donator tolerant prin administrarea neonatală a antigenelor receptorului, se poate preveni reacția grefă-contra-gazdă la gazdele cu populații de celule splenice tolerante imunologic. S-a arătat că celulele splenice parentale (de exemplu, C57BL), incubate *in vitro* cu o suspensie de celule hepatice $(C57BL \times BN)F_1$, își pierd activitatea anti-F_1 (142); se poate presupune că acest fenomen se produce printr-un mecanism similar, cu toate că posibilitatea de inducere a imunotoleranței *in vitro* nu a fost demonstrată în mod convingător (524). Această observație a fost confirmată de asemenea de Mathé și colab. (384, 385), care au arătat că măduva osoasă omologă incubată numai în soluția Tyrode, timp de 2 ore la 37°, își diminuează activitatea antigazdă. Recent, van Bekkum (44) a descris distrugerea selectivă a celulelor competente imunologic din suspensiile celulare de măduvă osoasă și țesut limfoid ganglionar prin stocarea la 4°. Folosirea celulelor deficiente în mod normal în factori de competență imunologică poate fi inclusă de asemenea printre metodele de acest tip. S-a demonstrat, de exemplu, că celulele splenice obținute de la donatori imaturi din punct de vedere imunologic (605, 607) nu pot induce reacția grefă-contra-gazdă. Administrarea celulelor moarte (celule homogenizate sau extracte tisulare) în scopul de a induce toleranța imunologică (381) va evita, desigur manifestarea reacției grefă-contra-gazdă.

Deoarece țesuturile interesate în această reacție sînt mai ales țesuturile limfoide, este de presupus că existența unui himerism celular la receptor, constituit în largă măsură din celule limfoide originare de la donator, trebuie să împiedice dezvoltarea bolii omologe la receptor, atunci cînd acestuia i se administrează un număr suplimentar de celule de la donator. Această posibilitate a fost sugerată pentru prima dată de experiențele lui Simons și colab. (542), care au studiat letalitatea șoarecilor C3H iradiați cu raze Röntgen și protejați inițial cu celule de măduvă osoasă de proveniență AKR, care după 21 de zile au fost inoculați cu celule limfoide de aceeași proveniență. A doua

Scanned with OKEN Scanner

administrare de celule AKR nu a provocat o formă accelerată de boală omologă şi, în mod surprinzător, supravieţuirea acestor şoareci a fost mai lungă decît a celor trataţi numai cu celule de măduvă osoasă AKR. Semnificaţia acestor experienţe a fost amplificată prin observaţiile lui Fox şi Howard (214), care au constatat că la şoareci BDF_1 injectaţi cu celule splenice C57BL nu se dezvoltă reacţia grefă-contra-gazdă, dacă se injectează cu 20—50 de zile mai tîrziu o a doua doză de celule splenice C57BL. Starea refractară dobîndită, datorită căreia reacţia grefă-contra-gazdă nu mai are loc în această circumstanţă, se extinde şi la administrarea de celule splenice CBA şi se datoreşte, probabil, eliminării acestor celule de către celulele C57BL existente în organism.

Asupra acestor metode şi a principiilor teoretice pe care ele se bazează s-au prezentat amănunte în altă secţiune a acestui capitol.

Cea de *a patra metodă* de prevenire a reacţiei grefă-contra-gazdă, aceea de a ataca celulele donatorului deja existente în gazdă, este de un interes deosebit. Această situaţie poate reprezenta realitatea practică a cazurilor de transplantare a măduvei osoase la om (8, 22, 46, 129, 143—145, 147, 181, 200, 226, 229, 281, 302, 326, 329, 334—336, 353, 455—458, 459, 481, 565, 599, 638, 644). Mai mult, dacă analogia dintre reacţia grefă-contra-gazdă şi anumite tipuri de boală autoimună la om este validă (460, 465, 572), această metodă poate reprezenta un sistem-model pentru studiul terapiei tulburărilor autoimune. Două căi principale au fost încercate pentru a distruge sau a inhiba celulele limfoide omologe care se angajează în reacţia grefă-contra-gazdă: imunologică şi chimică. Cea dintîi constă în administrarea unui antiser specific preparat împotriva antigenelor celulelor donatorului (504, 553) şi injectarea unor celule izologe competente imunologic la gazde incompetente imunologic (504, 553). Imunizarea mamei viitorului receptor cu celule specifice viitorului donator (553) este o altă cale de distrugere a celulelor antigazdă, probabil prin anticorpii primiţi prin placentă. O altă tehnică, probabil în corelaţie cu aceasta, mecanismul ei fiind însă în prezent obscur, implică administrarea unui ser imun, preparat pe animale din rasa donatorului cu ţesuturile unor animale din rasa receptorului (611).

Chemoterapia reacţiei grefă-contra-gazdă a fost preconizată de Uphoff (603), care a arătat că MTX previne boala secundară la receptori BDF_1, iradiaţi letal, cărora li s-au administrat celule din măduva osoasă de tipul C57BL. Se ştie că administrarea măduvei hematogene după iradiere totală protejează organismul faţă de depresiunea hematopoietică şi că acest efect este în funcţie de relaţiile imunologice dintre donator şi receptor (289, 602, 605). În experienţele lui Uphoff (602, 603, 605), 6-MP, antagonist al acidului folic, a fost injectată timp de 2 săptămîni după inocularea măduvei osoase, iar pentru un beneficiu maxim a trebuit să se utilizeze doze cu oarecare toxicitate. Observaţiile iniţiale ale lui Uphoff (602, 603) au fost confirmate şi de alţi autori (10, 358, 504, 524, 590, 642). Prednisolona şi alţi corticoizi s-au dovedit a inhiba reacţia grefă-contra-gazdă la embrionii de găină (623); totuşi, nici acest agent, nici 6-MP şi nici aminoclorambucilul nu reuşesc să întîrzie reacţia grefă-contra-gazdă la şoareci, cărora li s-a administrat o doză mortală de dimetilmileran şi măduvă osoasă omologă (208).

Scanned with OKEN Scanner

Efectul 6-mercaptopurinei, care suprimă reactivitatea imunologică la iepuri (496, 526, 577) şi şoareci (49—51, 392, 450, 641), asupra reacţiei grefă-contra-gazdă a fost studiat pe o combinaţie de şoareci hibrizi F_1 de către Barnes şi colab. (38), care au ajuns la următoarele concluzii: a) 6-MP în doză totală de 120 mg/kilocorp sau mai mult, administrată timp de 6 zile, provoacă hipoplazie splenică la şoarecii nou-născuţi, fapt demonstrat şi de Calne şi colab. (114); b) 6-MP în doză totală de 90 mg/kilocorp sau mai puţin, administrată în aceeaşi perioadă de timp, nu provoacă hipoplazia splenică; c) incidenţa reacţiei grefă-contra-gazdă de 82% la lotul de control este redusă la 55% la şoarecii supuşi tratamentului cu 6-MP în doză totală de 60—90 mg/kilocorp.

Aceste fapte atestă observaţiile anterioare ale lui Schwartz (522).

Russell (505, 506), utilizînd o altă substanţă imunosupresoare, azatioprina, a demonstrat că aceasta nu conferă o protecţie efectivă împotriva inoculării intravenoase la şoareci nou-născuţi a unor celule splenice incompatibile, competente imunologic.

Schwartz şi Beldotti (524) au studiat comparativ efectele a patru agenţi imunosupresori (6-MP, MTX, prednisona şi iradierea totală) asupra reacţiei grefă-contra-gazdă şi au stabilit că nu se pot trage concluzii generale asupra chimioterapiei în această condiţie. Mai mult, din datele acestor autori (524) reiese foarte evident că un agent poate fi imunosupresor într-o împrejurare şi imunostimulator în alta. Acest fapt a fost demonstrat prin efectele iradierii totale a organismului (171, 524), ale 6-MP (524, 548) ale MTX (524) şi prednisonei (524) asupra răspunsurilor imune la antigene proteice diferite şi asupra reacţiei grefă-contra-gazdă. De exemplu, atît prednisona, cît şi MTX pot fie să suprime, fie să accelereze reacţia grefă-contra-gazdă, aceasta depinzînd de momentul în care au fost administrate, în timp ce iradierea totală stimulează sau nu influenţează reacţia, după cum a fost efectuată într-un moment evolutiv sau altul.

Mecanismul supresiunii reacţiei grefă-contra-gazdă prin prednisonă nu este cunoscut.

În ceea ce priveşte MTX, este foarte evident că acţiunea sa este condiţionată de existenţa toleranţei imunologice specifice a grefei, cum se întîmplă în cazul antigenelor hibrizilor F_1. Această toleranţă este remarcabilă sub cel puţin trei aspecte: se induce la o populaţie de celule splenice de la şoareci adulţi, persistă deseori mai mult de un an şi este specifică. Russell (504) a găsit că 54% dintre şoareci nou-născuţi din linia C57BL/6 injectaţi cu celule splenice de la şoareci adulţi din linia DBA/1 şi trataţi cu MTX, devin deosebit de toleranţi faţă de grefe de piele de la aceşti şoareci adulţi, aplicate la vîrsta de 6 săptămîni. Woodruff (642) a obţinut date similare la şoarecii adulţi care au fost iradiaţi mai întîi cu doze subletale de radiaţii şi apoi inoculaţi cu celule splenice de la donatorii de piele respectivi. Utilizînd homogenat de celule, Uphoff (606) a indus cu MTX imunotoleranţa faţă de grefele de piele mai uşor decît cu celule omologe vii. Medawar (399), folosind un extract proaspăt care a conţinut antigene de transplantare, a descris de asemenea prelungirea supravieţuirii homografelor de piele la şoareci trataţi cu MTX. Nu există încă o explicaţie în legătură cu efectul profund al MTX asupra sistemelor imunologice. Totuşi, observaţiile potrivit cărora MTX, ca şi

Scanned with OKEN Scanner

6-MP (525) şi ciclofosfamida (507) pot induce o toleranţă de înaltă specificitate, sugerează eliminarea selectivă a unei anumite capacităţi imune a întregii populaţii de celule competente imunologic.

Ambrus şi Fetz (10, 11) au constatat că şi tratamentul donatorilor de măduvă hematogenă omologă cu cortizon sau agenţi alchilanţi măreşte mortalitatea şoarecilor receptori iradiaţi şi explică acest fapt prin existenţa în inocul a unor celule nucleate viabile de tip Schrek şi inhibiţia mitotică produsă de aceşti agenţi. Această explicaţie pare a fi valabilă pentru agenţii alchilanţi, dar este incompatibilă cu concepţiile actuale privind efectele cortizonului asupra măduvei osoase hematogene.

Aceste observaţii au importante implicaţii teoretice, care sînt greu de conciliat cu ideea că celulele formatoare de anticorpi acţionează, pur şi simplu, ca depozitari ai templatelor antigenice. Dacă acţiunea acestor substanţe se produce sau nu la nivel celular sau subcelular, este greu de precizat; important este însă faptul că toleranţa specifică poate fi indusă în ţesutul limfatic al adultului, cu ajutorul substanţelor citotoxice.

Mecanismul accelerării reacţiei grefă-contra-gazdă de către 6-MP, MTX, prednisonă şi iradiere este, practic, necunoscut. S-a socotit că iradierea întregului organism permite dezvoltarea cu mai multă uşurinţă a reacţiei grefă-contra-gazdă în cazul transplantării ţesuturilor parentale la hibrizi F_1 din cauză că celulele injectate pot prolifera în spaţiul creat de leziunea de iradiaţie (134). Deşi atrăgătoare, această ipoteză nu a fost demonstrată. De fapt, după 2 săptămîni de la iradiere totală (400 r) sau la 21 de zile de tratament cu 6-MP (10 mg/kilocorp/zi), splina şoarecilor este aproape normală din punct de vedere histologic (524); chiar în aceste condiţii, celulele splenice parentale, administrate la intervalele de timp respective, produc în mod rapid tulburări de tipul reacţiei grefă-contra-gazdă. Mai mult, este cunoscut că o proliferare celulară intensă se produce şi în ţesuturile limfoide ale animalelor neiradiate, care au fost expuse la acţiunea repetată a unor antigene. Ca atare, trebuie admisă intervenţia altor mecanisme în producerea acestui fenomen.

Exacerbarea reacţiei grefă-contra-gazdă prin iradierea totală a organismului, provocată la două sau mai multe luni după administrarea celulelor parentale, se poate datori anulării toleranţei imunologice. Mäkelä şi Nossal (364) şi Stone şi Owens (584) au arătat că toleranţa imunologică dobîndită poate fi abrogată prin iradiere, acest efect putîndu-se întîlni şi în reacţia grefă-contra-gazdă (523). O a doua eventualitate ar fi aceea că refacerea ţesuturilor limfoide după iradiere totală implică proliferarea activă a mai multor tipuri de celule, inclusiv acelea ale seriilor plasmocitare (96). Cauza acestei proliferări este necunoscută. Ea poate afecta şi celulele donatorului prezente în organismul receptorului în cursul perioadei pre- şi postiradiaţie. Este posibil ca unele produse de dezintegrare celulară, cum sînt acizii nucleici, eliberaţi ca rezultat al leziunilor de iradiaţie, să influenţeze activitatea celulelor competente imunologic. Merritt şi Johnson (404) au demonstrat efectul acizilor nucleici de a potenţa formarea anticorpilor la şoareci, iar Jarasalow (311) a arătat că celulele sau resturile celulare care conţin acizi nucleici pot restaura procesul de formare a anticorpilor la iepurii iradiaţi cu raze Röntgen. Observaţia lui Fukase şi Schwartz (217), conform căreia fracţiunea nucleară a sple-

nocitelor normale poate accelera în mod evident apariţia şi evoluţia reacţiei grefă-contra-gazdă, sprijină părerea că susceptibilitatea şoarecilor hibrizi F_1 faţă de celulele splenice parentale este exagerată de produsele celulare eliberate prin iradiere. Aceste observaţii sînt de asemenea aplicabile efectelor 6-MP, MTX şi prednisonei asupra reacţiei grefă-contra-gazdă. Este interesant de subliniat că aproximativ aceeaşi fază a reacţiei grefă-contra-gazdă, care s-a dovedit a fi relativ rezistentă la iradierea totală a organismului, este cu totul sensibilă la acţiunea MTX. Aceasta este faza în cursul căreia pot fi observate numeroase celule proliferante în ţesuturile receptorului şi, este foarte posibil ca aceste celule, la fel ca şi acelea întîlnite în faza productivă a formării anticorpilor umorali, să fie radiorezistente şi, în acelaşi timp, sensibile la MTX.

Un alt factor şi anume efectele agenţilor imunosupresori asupra unei reacţii potenţiale gazdă-contra-grefă, care s-a observat în anumite combinaţii de hibrizi F_1 cu părinţii lor (119, 150), trebuie avut de asemenea în vedere. Probabil că, dacă o asemenea reacţie ar fi suprimată prin iradiere cu raze Röntgen sau chimioterapie, receptorii hibrizi F_1 n-ar mai avea nici o apărare împotriva celulelor parentale şi ar sucomba rapid în urma atacului lor.

6-MP s-a dovedit a suprima o varietate mare de răspunsuri imune la numeroase specii, inclusiv şoarecii (521), animale folosite în mod preferenţial în cercetările privind reacţia grefă-contra-gazdă. Ca atare, efectul său de accelerare pronunţată a evoluţiei acestei reacţii, indiferent de doză şi de momentul administrării, nu a constituit un fapt neaşteptat. Astfel, chiar cu o doză de 10 mg/kilocorp/zi, care este o doză mică de 6-MP pentru şoarece, efectul de potenţare a reacţiei grefă-contra-gazdă este evident. Mai mult, datele histologice obţinute de la aceste animale demonstrează existenţa unor stadii diverse ale unei reacţii puternice grefă-contra-gazdă de la proliferarea celulelor primitive pînă la înlocuirea foliculilor splenici cu histiocite. Leziunile hepatice caracteristice pentru toxicitatea 6-MP (125) nu se găsesc în asemenea condiţii. Acţiunea toxică a substanţei, ca factor de modificare a reactivităţii animalelor, nu se poate aplica la MTX. De altfel, o oarecare toxicitate este necesară pentru a se realiza protecţia maximă nu numai împotriva bolii homologe, ci şi a altor stări de reactivitate modificată (603—606). André şi colab. (21) au constatat că 6-MP induce o proliferare extremă a hemocitoblaştilor şi nu poate întîrzia reacţia faţă de homografă la anumiţi iepuri. Aceşti autori au tras concluzia că la aceste animale apar celule limfoide rezistente la acţiunea 6-MP şi că este posibil ca un mecanism similar să fie implicat la hibrizii F_1 cărora li se administrează celule splenice parentale. Efectul 6-MP de potenţare a reacţiei grefă-contra-gazdă diferă de efectul asemănător al iradierii totale a organismului. Pretratamentul receptorilor cu 6-MP nu duce la mărirea capacităţii lor de a reduce numărul celulelor parentale. Pe de altă parte, pretratamentul prin iradiere totală permite să se provoace în mod invariabil reacţia grefă-contra-gazdă cu un număr relativ mic de celule ale donatorului. Oricare ar fi mecanismul de accelerare a reacţiei grefă-contra-gazdă prin 6-MP, el nu poate fi blocat prin inocularea receptorului cu celule limfoide omologe. Această observaţie sugerează că depleţia limfoidă crescută a receptorului, produsă prin administrarea acestor substanţe, nu poate fi considerată ca modul de acţiune a acestora.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește analogiile menționate mai înainte între autoimunizarea umană și reacția grefă-contra-gazdă, este important să se recunoască faptul că anemia hemolitică autoimună din leucemia limfoidă cronică sau din limfosarcom poate fi activată sau declanșată de iradiație sau de agenți alchilanți (524). La aceste cazuri, care evoluează liniștit pînă în momentul în care se începe tratamentul, se produce după aceea o hemoliză gravă, uneori mortală. Este de presupus că accelerarea reacției grefă-contra-gazdă prin iradiere totală a organismului sau chimioterapie și activarea bolii autoimune la oameni, prin agenți similari, se realizează prin mecanisme similare.

Ținînd seama de dificultățile de interpretare a efectelor agenților imunosupresori asupra unor sisteme relativ simple, cum ar fi răspunsul la antigene proteice purificate, interpretarea efectelor lor asupra reacției complexe grefă-contra-gazdă se reduce în prezent numai la cîteva tentative. Toate datele privind reacția grefă-contra-gazdă au, de altfel, un caracter labirintic, care face foarte dificilă orice încercare de sistematizare sau generalizare.

BIBLIOGRAFIE

1. Abeyounis C. J., Milgrom F., Witebschi E. — *Nature (Lond.)*, 1964, *203*, 313.
2. Adams R. A., Patt D. J., Metz B. R. — *Transplant. Bull.*, 1956, *3*, 41.
3. Aisenberg A. C., Wilkes B., Waksman B. H. — *J. exp. Med.*, 1962, *116*, 759.
4. Al-Askari S., Dumonde D. C., Lawrence H. S., Thomas L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 261.
5. Albert F., Lejeune-Ledant G. — *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.*, 1959, *24*, 92.
6. Algire G. H. — *Univ. Mich. med. Bull.*, 1956, *92*, 517.
7. Algire G. H., Weaser J. M., Prehn R. T. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1954, *15*, 493.
8. Almazov V. A., Riabov S. I., Tushinskaia M. M. — *Fer. Arkh.*, 1961, *33*, 89.
9. Altman B., Simonsen M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 28.
10. Ambrus C. M., Ambrus J. L., Fetz E. T. — *Transplantation*, 1966, *4*, 245.
11. Ambrus C. M., Feltz E. T. — *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 1958, *2*, 276.
12. Amiel J. L., Mathé G. — *Nature (Lond.)*, 1963, *200*, 1 225.
13. Amiel J. L., Mathé G. — *Blood*, 1964, *24*, 642.
14. Amos D. B. — *Brit. J. exp. Path.*, 1953, *34*, 464.
15. Amos D. B. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 273.
16. Amos D. B., Gorer P. A., Mikulska B. M., Billingham R. E., Sparrow E. M. — *Brit. J. exp. Path.*, 1954, *35*, 203.
17. Amos D. B., Gorer P. A., Mikulska B. M. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1955, *144*, 369.
18. Amos D. B., Haughton G., Spencer R. H. — *Immunology*, 1963, *6*, 370.
19. Amos D. B., Wakefield J. D. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1959, *22*, 1 077.
20. André J., Schwartz R. S., Mitus W. J., Dameshek W. — *Blood*, 1962, *19*, 313.
21. André J. A., Schwartz R. S., Mitus W. J., Dameshek W. — *Blood*, 1962, *19*, 334.
22. Andrews G. A. — *J. Amer. med. Ass.*, 1962, *179*, 191.
23. Archer O., Pierce J. C. — *Fed. Proc.*, 1961, *20*, 26.
24. Archer O. A., Pierce J. C., Papermaster B. W., Good R. A. — *Nature (Lond.)*, 1962, *195*, 191.
25. Arnason B. G., Jankovic B. D., Waksman B. H. — *Nature (Lond.)*, 1962, *194*, 99.
26. Askonas B. A., White R. G. — *Brit. J. exp. Path.*, 1956, *37*, 61.
27. Auerbach R. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1961, *47*, 1 175.
28. Bainbridge D. R., Brent L., Gowland G. — *Transplantation*, 1966, *4*, 138.
29. Balner H., de Vries M. J., Bekkum D. W. van — *J. nat. Cancer Inst.*, 1964, *32*, 419.
30. Ballantyne P. L., Siegel W. H., Converse J. M. — *Plast. reconstr. Surg.*, 1963, *32*, 310.
31. Ballantyne P. L., Siegel W. H., Kapitchnikov M. M. — *Transplant. Bull.*, 1962, *30*, 143.
32. Ballantyne P. L., Stetson C. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 7.

Scanned with OKEN Scanner

33. Barnes A. D. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 237.
34. Barnes D. W. H., Ford C. E., Ilbery P. L. T., Loutit J. F. — *Transplant. Bull.*, 1958, *5*, 101.
35. Barnes A. D., Krohn P. L. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1957, *146*, 505.
36. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Micklem H. S. — *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 374.
37. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Micklem H. S. — Mechanisms of Immunological Tolerance (M. Hašek, A. Lengerová, M. Voztisková), Ed. Czech. Acad. Sc., Praga, 1962, p. 371.
38. Barnes B. A., Schad P. B., Pinn V. W. — *Transplantation*, 1966, *4*, 154.
39. Basch R. S., Stetson C. A. — *Transplantation*, 1963, *1*, 469.
40. Batchelor J. R. — *Immunology*, 1960, *3*, 174.
41. Batchelor J. R., Boyse E. A., Gorer P. A. — *Transplant. Bull.*, 1960, *26*, 449.
42. Batchelor J. R., Silverman M. S. — Ciba Foundation Symposium on Transplantation (Wolstenholme G. E. W., Cameron M. P.), Ed. Churchill, Londra, 1962, p. 216.
43. Bekkum D. W. van — Mechanisms in Radiobiology. Multicellular organisms (M. Errara, A. Forssberg), vol. 2, Ed. Academic Press, New York, 1960, p. 297.
44. Bekkum D. W. van — *Transplantation*, 1964, *2*, 393.
45. Bekkum D. W. van, Putten L. M. van, Vries M. J. de — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 550.
46. Bekkum D. W. van, Vos O., Weyzen W. W. H. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1959, *23*, 75.
47. Bekkum D. W. van, Vos O. — *Int. J. Radiat. Biol.*, 1961, *3*, 173.
48. Belcher E. H., Harriss E. B., Lamerton L. F. — *Brit. J. Haemat.*, 1958, *4*, 390.
49. Berenbaum M. C. — *Nature (Lond.)*, 1960, *185*, 167.
50. Berenbaum M. C. — *Biochem. Pharmacol.*, 1962, *11*, 29.
51. Berenbaum M. C., Brown I. N. — *Immunology*, 1964, *7*, 65.
52. Berrian J. M., Brent L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 654.
53. Biering F. — Ciba Foundation Symposium on Haematopoiesis: Cell Production and its Regulation (G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor), Ed. Churchill, Londra, 1960, p. 185.
54. Biggs P. M., Payne L. N. — *Nature (Lond.)*, 1959, *184*, 1 594.
55. Billingham R. E. — Transplantation of Tissues and Cells (R. E. Billingham, W. K Silvers), Ed. Wistar Institute Press, Philadelphia, 1961, p. 1.
56. Billingham R. E., Brent L. — *Brit. J. exp. Path.*, 1956, *37*, 566.
57. Billingham R. E., Brent L. — *Transplant. Bull.*, 1957, *4*, 67.
58. Billingham R. E., Brent L. — *Philos Transact.* B., 1959, *242*, 439.
59. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1954, *143*, 58.
60. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1954, *143*, 68.
61. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Nature (Lond.)*, 1956, *178*, 514.
62. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Philos. Trans. Soc. B.*, 1956, 239,357.
63. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Transplant. Bull.*, 1958, *5*, 377.
64. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B., Sparrow E. M. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1954, *143*, 43.
65. Billingham R. E., Ferrigan L. W., Silvers W. K. — *Science*, 1960, *132*, 1 488.
66. Billingham R. E., Ferrigan L. W., Silvers W. K. — *Transplant. Bull.*, 1961, *27*, 142.
67. Billingham R. E., Medawar P. B. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1962, *155*, 392.
68. Billingham R. E., Parkes H. S. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1955, *143*, 550.
69. Billingham R. E., Silvers W. K. — *J. Immunol.*, 1959, *82*, 448.
70. Billingham R. E., Silvers W. K. — *Transplant. Bull.*, 1959, *6*, 399.
71. Billingham R. E., Silvers W. K. — *J. exp. Zool.*, 1961, *146*, 113.
72. Billingham R. E., Silvers W. K. — Mechanisms of Immunological Tolerance (M. Hašek, A. Lengerová, M. Voztisková), Ed. Czeh. Acad. Sc., Praga, 1962, p. 21.
73. Billingham R. E., Silvers W. K. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1963, *17*, 531.
74. Billingham R. E., Silvers W. K., Wilson D. B. — *Lancet*, 1962, *1*, 512.
75. Billingham R. E., Silvers W. K., Wilson D. B. — *J. exp. Med.*, 1963, *118*, 397.
76. Billingham R. E., Sparrow E. M. — *J. exp. Biol.*, 1954, *31*, 16.
77. Billingham R. E., Sparrow E. M. — *J. Embryol. exp. Morph.*, 1955, *3*, 266.
78. Biozzi G., Stiffel C., Halpern B. N., Mouton D. — *Rev. franç. Étud. clin. biol.*, 1960, *5*, 876.

Scanned with OKEN Scanner

332. Kretschmer R. R., Pérez-Tamayo R. — J. *exp. Med.*, 1961, *114*, 509.
333. Kuhns W. J., Rapaport F. T., Lawrence H. S., Converse J. M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 36.
334. Kurdibailo F. V., Petrov N. S. — *Sovetsk. Med.*, 1962, *26*, 46.
335. Kurnick N. B. — *Transfusion*, 1962, *2*, 178.
336. Lal V. B. — Proceedings of the IXth Congress of the International Society of Blood Transfusion (Mexico), Ed. Karger, Basel, 1964, p. 294.
337. Lambert P. B., Frank A. H., Bellman S., Farnsworth D. — *Transplantation*, 1965, *3*, 62.
338. Lawrence H. S. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *64*, 826.
339. Lawrence H. S. — *Physiol. Rev.*, 1959, *39*, 811.
340. Lawrence H. S. — *Ann. Rev. Med.*, 1960, *11*, 207.
341. Lawrence H. S., Al. Askari S., David J., Franklin E. C., Zweinman B. — *Trans. Ass. Amer. Phycns*, 1963, *76*, 84.
342. Lawrence H. S., Pappenheimer A. M. — *J. exp. Med.*, 1956, *104*, 321.
343. Lawrence H. S., Rapaport F. T., Converse J. M., Tillett W. S. — *J. clin. Invest.*, 1960, *39*, 85.
344. Lawrence H. S., Rapaport F. T., Converse J. M., Tillett W. S. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 223.
345. Lawrence H. S., Rapaport F. T., Converse J. M., Tillett W. S. — The second International Symposium on Immunopatology, Ed. Schwalbe, Basel, 1961, p. 204.
346. Lawrence H. S., Rapaport F. T., Converse J. M., Tillett W. S. — Ciba Foundation Symposium on Transplantation (G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron), Ed. Churchill, Londra, 1962, p. 271.
347. Latta H. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1959, *5*, 405.
348. Lejeune G. — Contribution à l'étude des réponses de l'hôte à l'homogreffe cutanée, Ed. Arscia, Bruxelles, 1962.
349. Lejeune-Ledant G. — *Bull. Acad. roy. Med. Belg.*, 1960, *25*, 394.
350. Lejeune-Ledant G. — Ciba Foundation Symposium on Transplantation (G.E.W. Wolstenholme, M. F. Cameron), Ed. Churchill, Londra, 1962, p. 25.
351. Lejeune-Ledant G., Albert F. H. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 308.
352. Lejeune-Ledant G., Castermans A., Dieu H. A., Haenen-Severyns A. H., Vranken-Paris M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 487.
353. Lenzi M. — *Panminerva med.*, 1961, *3*, 91.
354. Leonard L., Albright E. — *Transplantation*, 1963, *1*, 149.
355. Levinthal J. D., Buffett R. F., Furth J. — *Proc. Soc. exp. biol. (N. Y.)*, 1959, *100*, 610.
356. Lind P. E., Szenberg A. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1961, *39*, 507.
357. Lindner A. — *Amer. J. clin. Path.*, 1960, *34*, 426.
358. Lochte H. L., Levy A. S., Guenther D. M., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Nature (Lond.)*, 1962, *196*, 1 110.
359. Loutit J. F. — *Lancet*, 1962, *2*, 1 106.
360. Loutit J. F., Miklem H. S. — *Brit. J. exp. Path.*, 1962, *43*, 77.
361. Loutit J. F., Miklem H. S. — Mechanisms of Immunological Tolerance (M. Hašek, A. Lengerová, M. Voztisková, Ed. Czech. Acad. Sc., Praga, 1962, p. 371.
362. Maclean L. D., Zak S. J., Vasco R. L., Good R. A. — *Transplant. Bull.*, 1957, *4*, 21.
363. Mäkälä O., Mitchison N. A. — *Immunology*, 1965, *8*, 549.
364. Mäkälä O., Nossal G. J. V. — *J. Immunol.*, 1962, *88*, 613.
365. Makinodan T. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1956, *92*, 174.
366. Makinodan T., Gengozian N., Congdon C. C. — *J. Immunol.*, 1956, *77*, 250.
367. Makinodan T., Gengozian N., Shekarchi I. C. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1958, *20*, 591.
368. Mann L. T., Corson J. M., Dammin G. J. — *Nature (Lond.)*, 1960, *187*, 774.
369. Mann L. T., Corson J. M., Dammin G. J. — *Nature (Lond.)*, 1962, *193*, 168.
370. Mann L. T., Corson J. M., Dammin G. J. — *Nature (Lond.)*, 1963, *199*, 499.
371. Mannick J. A., Egdall R. H. — *Ann. Surg.*, 1962, *156*, 356.
372. Manson L. A., Foschi G. V., Dougherty T., Palm J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 251.
373. Manson L. A., Foschi G. V., Duplan J. F., Zaalberg O. B. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *101*, 121.

Scanned with OKEN Scanner

618. Walford R. L., Hildemann W. H. — *Transplantation*, 1964, *2*, 87.
619. Wallach D. F. H., Hager E. G. — *Nature (Lond.)*, 1962, *196*, 1 004.
620. Waksman J. — Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State (H. S. Lawrence), Ed. Hoeber-Harper, New York, 1959, p. 5.
621. Waksman B. H. — *Lab. Invest.*, 1963, *12*, 46.
622. Warner N. L. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1964, *42*, 417.
623. Warner N. L., Burnet F. M. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1961, *39*, 325.
624. Warner N. L. Szenberg A. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1964, *42*, 100.
625. Warner N. L., Szenberg A. — *Brit. J. exp. Path.*, 1964, *45*, 459.
626. Warwick W. J., Archer K., Good R. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 588.
627. Weaver J. M., Algire G. H., Prehn K. T. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1955, *15*, 1 737.
628. Weinrach R. S., Talmage D. W. — *J. infect. Dis.*, 1958, *102*, 74.
629. Weisberger A. S., Guyton R. A., Heinle R. W., Storaasli J. P. — *Blood*, 1951, *6*, 916.
630. Weiser R. S., Grange G. A., Brown W., Baker P., Jutila J., Holmes B. — *Transplantation*, 1965, *3*, 10.
631. Wiener J., Spiro D., Russell P. S. — *Amer. J. Path.*, 1964, *44*, 319.
632. Willard H. G., Hoppe I. B. H., Nettesheim P. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.)*, 1965, *118*, 993.
633 Willard H. G., Smith L. H. — *Transplantation*, 1966, *4*, 56.
634. Wilson D. B. — *J. cell. comp. Physiol.*, 1963, *62*, 273.
635. Wilson R. E., Crosby D. L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 588.
636. Winn H. J. — *J. nat. Cancer Inst., Monograph* 1959, *2*, 1 014.
637. Wissler R. W., Ficht F. W., LaVia M. F., Gunderson C. H. — *J. cell. comp. Physiol.*, 1957, *50*, 265.
638. Witte S. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1961, *86*, 1 334.
639. Woodruff M. F. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *64*, 1 014.
640. Woodruff M. F. A. — The Transplantation of Tissues and Organs, Ed. Ch. Thomas, Springfield, 1960, p. 100.
641. Woodruff M. F. A. — *Transplant. Bull.*, 1961, *27*, 447.
642. Woodruff M. F. A. — *Nature (Lond.)*, 1962, *195*, 727.
643. Woodruff M. F. A., Anderson N. F. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 119.
644. Woodruff M. F. A., Nolan B. — *Lancet*, 1961, *2*, 689.
645. Yamakawa T., Iris R., Iwanaga M. — *J. Biochem.*, 1960, *48*, 490.
646. Young L. E., O'Brien W. A., Swisher S. N., Miller G., Ymile C. L. — *Amer. J. vet. Res.*, 1952, *13*, 207.
647. Zaalberg O. B., Weyzen W. W. H., Vos O. — *Nature (Lond.)*, 1963, *197*, 300.
648. Zalesky E., Chiyo Chiba, Jiro Yamahaka, Bing R. J. — *J. Lab. clin. Med.*, 1963, *62*, 1 023.
649. Zotikov E. A., Budik V. M., Puza A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 166.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL al IV-lea

ASPECTE MORFOPATOLOGICE ALE TRANSPLANTĂRII DE ŢESUTURI ŞI ORGANE

A. VASCULARIZAŢIA ORGANULUI TRANSPLANTAT

Procesul irigării ţesutului sau organului transplantat este determinant pentru relaţiile sale cu receptorul. Acest proces implică fie revascularizarea unui ţesut ale cărui conexiuni vasculare nu se restabilesc prin operaţia de transplantare, fie irigarea unui ţesut prin intermediul propriului său sistem vascular. Revascularizarea ţesutului transplantat a fost studiată în special pe grefele de piele, folosindu-se o serie largă de metode (examen histologic, tehnici de injectare, cameră transparentă, microscopie tegumentară) (182).

1. REVASCULARIZAREA GREFELOR DE PIELE

Examenele histologice care au adus informaţii importante asupra modalităţilor de nutriţie a grefelor de piele nu au rezolvat problemele de detaliu. Cu ajutorul examenului histologic s-a putut preciza că, la cîteva minute după transplantarea pielii, vasele mici din patul tegumentar al receptorului se dilată şi, consecutiv, se produce exsudarea plasmei. Leucocitele şi histiocitele se acumulează rapid în acest exsudat şi lichidul conţinînd asemenea celule îşi face loc în vasele preexistente ale grefei. Acest fenomen, observat de Goldman [citat de (182)] în 1894 şi numit de el „circulaţia plasmatică", pare a juca un rol important în nutriţia grefei de piele imediat după aplicarea ei. Pe baza examenelor histologice s-au emis păreri contradictorii asupra naturii procesului de revascularizare a grefei: părerii conform căreia grefa este invadată de vase noi din patul de grefare, care ar putea folosi însuşi lumenul vaselor grefei, i s-a opus o altă părere, potrivit căreia vasele grefei degenerează complet. Ulterior, s-a susţinut că anastomoze între vasele grefei şi vasele patului de grefare ar asigura irigaţia acestuia sau că insule din endoteliul vaselor grefei nu ar suferi procesul de degenerare şi ar constitui punctul de plecare a noilor vase (182). Aceste ipoteze au astăzi doar o importanţă documentară.

Cu ajutorul metodei de injectare a unor substanţe colorate, Davis şi Trout (42) au arătat că revascularizarea grefelor de piele se realizează în două stadii şi anume: primul stadiu care începe la aproximativ 22 de ore după grefare şi se încheie la sfîrşitul celei de a 3-a zi, cel de al II-lea stadiu care începe din ziua a 4-a fiind cel mai important. În primul stadiu, capilarele patului de grefare se

Scanned with OKEN Scanner

anastomozează cu capilarele existente în grefă, pe cînd în stadiul al II-lea, sistemul vascular al grefei este invadat de capilarele acestuia. O circulaţie adecvată, care să asigure supravieţuirea grefei, nu se stabileşte decît în aproximativ 8 zile de la grefare.

Aceste observaţii au fost confirmate şi de alţi autori (107).

Examinarea grefelor de piele după metoda camerei transparente (2, 35, 36) a dus la o serie de constatări, care pot fi rezumate astfel: imediat după operaţie, camera se umple cu lichid, care în decurs de 24 de ore devine din ce în ce mai populat cu celule şi, deci, mai vîscos. Controlul vasomotor este tulburat de trauma operatorie; arteriolele şi metaarteriolele sînt dilatate în unele porţiuni ale lungimii lor şi contractate în altele. Se formează multiple anastomoze arterio-venoase; apare staza şi tendinţa la tromboză. După 4—6 zile, capilarele din ţesutul subiacent din imediata vecinătate a grefei dau naştere la muguri vasculari; acest proces atinge nivelul maxim la 7—10 zile de la transplantare. Se poate observa în acest timp umplerea şi golirea alternativă a capilarelor, ca urmare a activităţii sfincterului precapilar.

Pe baza unor observaţii microscopice, Taylor şi Lehrfeld (169) au afirmat că în autogrefe de piele vasele sînt dilatate şi pline cu sînge chiar începînd cu a 2-a zi după transplantare şi că după 5 zile circulaţia în grefă se restabileşte aproape complet, pe baza anastomozelor dintre vasele patului de grefare şi acelea ale grefei.

Date oarecum concordante au fost obţinute şi prin metoda controlului sub iluminare ultravioletă a grefelor de piele după administrarea de fluoresceină (48, 92).

Mai recent, utilizarea unor tehnici histochimice diverse a permis obţinerea unor informaţii valoroase asupra activităţii celulare şi a revascularizării grefelor de piele. Converse şi Ballantyne (30), folosind metoda cu săruri de neotetrazolium şi DPNH pentru studiul activităţii DPNH-dehidrogenazei (DPN-diaforazei), au evidenţiat viabilitatea epiteliului, a unităţilor pilosebacee, a fibroblaştilor, a celulelor endoteliale şi musculare netede din pereţii vasculari şi a filetelor nervoase, dar nu au reuşit să evidenţieze activitatea enzimei în fibrele elastice şi fibrele de colagen dermice din grefe suprapaniculare de piele (cu o grosime mare). DPNH-dehidrogenaza, furnizînd informaţii asupra capacităţii funcţionale a lanţului transportorilor de electroni, este un indicator mai sigur asupra viabilităţii celulelor decît alte dehidrogenaze, ale căror modificări de

Fig. 33. — Grefă subţire de piele pe pat dermic după o zi de la transplantare. A se nota canalul endotelial nou (2) cu originea în vasul patului dermic situat aproape de *panniculus carnosus* (1) (× 250) (secţiunile au fost incubate cu DPNH şi clorat de neotetrazolium, timp de 2 ore) [după Converse şi colab. (33)].

Scanned with OKEN Scanner

activitate pot reprezenta remanieri adaptative de metabolism (26, 76, 114, 148). Aceiaşi autori (32, 33) au studiat prin metode histochimice şi stereomicroscopice (170) sursa neoformaţiei vasculare şi modul revascularizării autografelor dermice, subţiri, plasate pe un pat dermic şi au constatat că în ziua următoare transplantării, vasele sanguine din stratul profund al patului dermic, în apropiere de *panniculus carnosus*, prezintă dilataţii marcate şi că mugurii endoteliali, care se transformă ulterior în canale, prelungesc aceste dilataţii vasculare (fig. 33). În contrast cu acestea, vasele din restul patului dermic, incluzînd pe acelea de suprafaţă, în imediata vecinătate a grefei suprapuse, nu prezintă nici o distensiune sau proliferare endotelială. În acest interval de timp nu se poate evidenţia invadarea grefei de către vasele gazdei şi nici circulaţia hemică în vasele grefei (fig. 34 *A*). După 48 de ore de la transplantare, vasele de neoformaţie ale patului vascular continuă invadarea patului dermic de grefare (fig. 34 *B*). Un număr mic dintre acestea poate atinge linia de demarcaţie dintre patul de grefare şi grefă. Uneori, aceste vase noi sînt înconjurate de o tunică, de formă conică, de celule grăsoase. După 72 de ore de la transplantare are loc o creştere progresivă, rapidă, a numărului, ramificaţiilor şi lumenului vaselor de neoformaţie în patul dermic şi în grosimea grefei (fig. 34 *C*). Aşadar, într-o perioadă scurtă, de numai 3 zile, grefa este revascularizată complet şi dispune de o reţea extensivă de vase sanguine dilatate, cu alte caracteristici funcţionale decît acelea ale vaselor preexistente. Deşi numeroase capilare noi se află în imediata vecinătate a vaselor originale ale grefei, Converse şi colab. (30, 33) nu au reuşit să evidenţieze nici inocularea şi nici conectarea directă între aceste două tipuri de vase. În zilele următoare, vasele dilatate ale grefei şi ale patului de grefare devin mai puţin numeroase şi de calibru mai mic. Vasele sanguine originare ale grefei de piele îşi menţin activitatea enzimatică o perioadă de 3—5 zile după transplantare, această perioadă fiind condiţionată de grosimea grefei (31). După această perioadă, vasele degenerează (30).

Între vasele preexistente ale grefei de piele şi vasele de neoformaţie există diferenţe structurale evidente. Cele dintîi sînt cilindrice şi drepte, cu strat endotelial gros şi lumen îngust şi posedă o tunică fibroasă, cu sau fără fibre musculare netede. Vasele de neoformaţie, invadante, au pereţi subţiri, dilataţi, sînt sinusoidale şi cu contur neregulat şi nu prezintă tunici fibroase sau musculare (12, 30).

În cazul reacţiei de eliminare accelarată, de tip *second set*, în grefa de piele se dezvoltă o vascularizaţie extensivă, care asigură un debit sanguin mare, înainte ca să se producă eliminarea (care are loc după 4—6 zile). Dacă intervalul dintre prima şi cea de a 2-a grefă de piele este de 6—7 zile, grefa urmează una dintre următoarele două căi: a) reacţia de eliminare de tip *second set* sau b) reacţia „grefei albe" (11).

Ca succesiune a fenomenelor vasculare între homografa de piele iniţială şi cea de a doua homografă de la acelaşi donator la acelaşi receptor nu există deosebiri în primele 3—4 zile de la transplantare; după acest interval de timp apar în cea de a doua homografă de piele rupturi vasculare şi hemoragii (10, 170). Reducerea activităţii DPN-diaforazei este însă mai precoce în grefa de piele secundară decît în cea primară şi se manifestă mai ales în fibroblaşti şi glandele sebacee (12).

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește reacția „grefei albe", care a fost descrisă atît la om (75, 101, 138, 140), cît și la numeroase alte specii animale (15, 16, 29, 93, 95, 96, 163, 165) și a cărei semnificație imunologică este încă incertă, ea are drept substrat morfologic, potrivit părerii a numeroși cercetători (15, 16, 29, 75, 93,

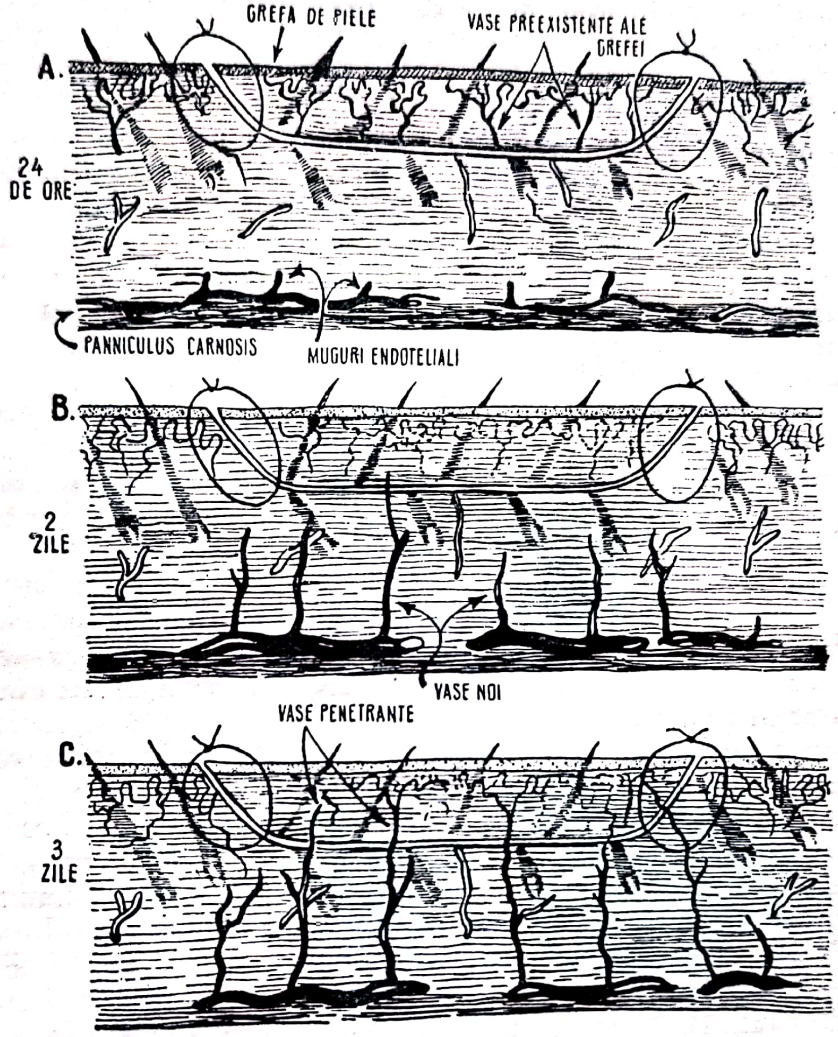


Fig. 34. — Schema revascularizării autografei suprapaniculare de piele, plasată pe pat dermic de grefare.

A — după 24 de ore de la transplantare: muguri endoteliali originari din vasele sanguine ale stratului dermic profund al gazdei au traversat 1/5 din dermul patului de grefare; *B* — după 48 de ore de la transplantare: vasele sanguine noi ale patului de grefare au atins suprafața sa; *C* — după 72 de ore de la transplantare: vasele sanguine ale patului de grefare au pătruns în grosimea grefei [după Converse și colab. (33)].

95, 96, 101, 138—140, 163—165), lipsa revascularizării grefei. Această particularitate o deosebește de rejecția de tip *second set* a homografelor de piele, caz în care are loc irigarea grefei înainte de rejecție. Așadar, „grefa albă" nu este de loc revascularizată sau tentativa de revascularizare este abortivă și nu este acceptată de gazdă nici măcar temporar (95, 96, 163, 164). Lipsa de vascularizare a „grefei albe" a fost dedusă din lipsa sîngerării grefei după secționare

Scanned with OKEN Scanner

(93, 165), din absența unui flux sanguin detectabil (95, 138—140, 164), din lipsa pătrunderii în grefă a coloranților administrați intravenos (164), și din evidența stereomicroscopică și histochimică recentă (10, 12, 29—31, 33, 75).

Din punct de vedere histochimic, în primele 24 de ore de la transplantare, grefa secundară și „grefa albă" nu se deosebesc între ele. După 24 de ore, însă, activitatea enzimatică în „grefa albă" este foarte mult limitată, iar după 48 de ore este practic inexistentă (12). Sub acest aspect există o evidentă precesiune a „grefei albe" față de grefa secundară.

Homografele de piele secundare, transplantate la 5 zile după homografa primară, urmează o evoluție atipică, în cursul căreia se pot deosebi fenomene caracteristice atît evoluției unei grefe secundare, cît și evoluției unei „grefe albe". Astfel, deși dezvoltarea vaselor din patul de grefare în primele 2 zile după transplantare este similară aceleia din grefa secundară, nu se stabilește circulația sanguină în grefă întocmai ca în „grefa albă". Grefele atipice nu prezintă rupturi vasculare și hemoragii, capătă o culoare verzuie și se elimină într-un mod cu totul particular (11, 12).

Timpul de supraviețuire a „grefei albe" este o problemă discutabilă. În general se susține, așa cum s-a mai arătat, că „grefa albă" nu este acceptată de gazdă nici măcar temporar (95, 96, 163—165) și că timpul de supraviețuire este, deci, zero. Dacă se consideră că încetarea circulației sanguine sau plasmatice reprezintă punctul terminal al supraviețuirii unei grefe (170), atunci înseamnă că „grefa albă", care nu este revascularizată, nu supraviețuiește. Dacă însă se ia drept criteriu de supraviețuire a grefei evidența histochimică și, în special, activitatea DPN-diaforazei (12, 33), se poate afirma că „grefa albă" are o supraviețuire de cel puțin 24 de ore și că, în consecință, ea este acceptată de organism pentru un scurt timp, insuficient pentru ca ea să se revascularizeze.

Aceste speculații oferă suport pentru concepția „spectrului imunologic" al reacțiilor homografei (12, 75), care s-ar întinde între eliminarea relativ lentă a grefei primare și eliminarea rapidă, foarte precoce, a „grefei albe", avînd ca forme intermediare eliminarea accelerată de tip *second set* a homografelor aplicate unor receptori condiționați și eliminarea grefelor atipice. Eliminarea grefei primare este asimilată de Henry și colab. (75) cu hipersensibilizarea de tip întîrziat față de un antigen neîntîlnit anterior de receptor, iar eliminarea „grefei albe" este socotită ca rezultatul acțiunii duble a anticorpilor circulanți (produși ca răspuns față de grefa primară) și a unei reacții celulare întîrziate, adică ar fi vorba de un fenomen analog componentei duble a reacțiunii Arthus, așa cum a sugerat-o Gell și Hinde (64). Cînd anticorpii se află într-un titru scăzut, grefa secundară suferă o eliminare accelerată, mediată de răspunsul celular de tip întîrziat. Stetson (164) a presupus că reacția „grefei albe" este expresia unui titru înalt de anticorpi circulanți, produși ca răspuns la homografa primară, în timp ce eliminarea accelerată este manifestarea unui răspuns anamnestic inițiat de homografa secundară.

2. VASCULARIZAREA GREFELOR DE CORNEE

Corneea normală nu este vascularizată și această stare trebuie să fie menținută și în grefele de cornee. S-a stabilit că edemul local este precursorul vascularizării corneei, favorizînd pătrunderea vaselor de neoformație în țesut.

Scanned with OKEN Scanner

Ashton şi Cook (9) au subliniat importanţa căilor preexistente între lamelele corneei adiacente regiunii vascularizate care o înconjură. Nu se ştie încă dacă edemul se datoreşte creşterii hidrofiliei fibrilelor de colagen ale stromei sau dacă apa este reţinută de mucopolizaharidele sale. Ashton (8) este de părere că pentru a se produce neovascularizarea corneei este necesar un stimul şi că acest stimul ar fi un metabolit tisular generat în condiţiile hipoxice posttraumatice. Această presupunere se bazează pe observaţiile sale privind vascularizaţia retinei la animale şi condiţiile neoformaţiei de vase în acest ţesut (presiunea celulelor viabile, vasele de neoformaţie apărînd rar în ţesuturi necrotice; presiunea parţială de oxigen scăzută în ţesut; drenaj venos deficitar).

Clinic se diferenţiază două tipuri de vascularizare a grefei de cornee: a) Vase superficiale, care pătrund în grefă prin colateralele arborizaţiilor lor; aceste vase care provin din vasele conjunctivale adiacente ale gazdei atacă grefa la suprafaţa ei. b) Vase profunde, care pătrund între lamelele grefei de la marginile ei şi se ramifică abundent. Vasele din prima categorie nu provoacă tulburări grave, dat fiind că, în general, ele se reduc progresiv, pînă la dispariţie, însă vasele din cea de a doua categorie persistă şi compromit grefa prin influenţele imunologice pe care le favorizează şi prin fibrozare. Frecvent, totuşi, deşi aceste vase pătrund în grefă în stadiile iniţiale ale fazei postoperatorii, după 3—4 săptămîni sînt strangulate de ţesutul fibros al joncţiunii dintre grefă şi ţesuturile gazdei. Un oarecare grad de vascularizare superficială a grefelor de cornee se realizează de regulă, dar dacă vascularizarea stromei persistă 14—20 de zile şi continuă să invadeze grefa, înseamnă că s-a declanşat răspunsul imunologic al receptorului. După părerea lui Rycroft (145), această situaţie nu este atît de comună pe cît a fost considerată pînă acum. În primele zile după grefarea corneei, cînd numeroase cauze pot contribui la insuccesul grefării (defecte de tehnică chirurgicală, material biologic conservat defectuos sau de calitate neadecvată, afecţiuni în evoluţie ale gazdei etc.) s-a invocat prea frecvent răspunsul imunologic drept cauză a opacifierii grefei. Pe baza datelor clinice actuale se poate afirma că răspunsul imunologic al receptorului faţă de grefa de cornee este rar, fapt atestat de reducerea numărului de insuccese, pe măsură ce s-a acumulat o mai mare experienţă clinică. Nu este însă mai puţin adevărat că şi mijloacele de a trata o grefă de cornee vascularizată s-au înmulţit în ultima vreme (peritomie conjunctivală, aplicare locală de steroizi, iradiere cu raze β de la o sursă de ^{90}Sr).

3. IRIGAŢIA ORGANELOR VISCERALE TRANSPLANTATE

O dată cu dezvoltarea unor metode satisfăcătoare de anastomoză vasculară a devenit posibilă transplantarea majorităţii organelor (rinichi, plămîn, inimă, ficat, splină, tiroidă, glandă suprarenală, ovar etc.). În principiu, ceea ce este esenţial din punct de vedere tehnic în aceste circumstanţe este ca refacerea circuitului sanguin şi a celui funcţional (anastomoza ureterului în cazul rinichiului, a bronhiilor în cazul plămînului sau a canalului coledoc în cazul ficatului) să se efectueze cît mai repede, pentru a se minimaliza efectele ischemiei asupra organului transplantat. Din acest punct de vedere, singura deosebire dintre aceste organe este constituită de gradul rezistenţei lor la lipsa de oxigen.

Scanned with OKEN Scanner

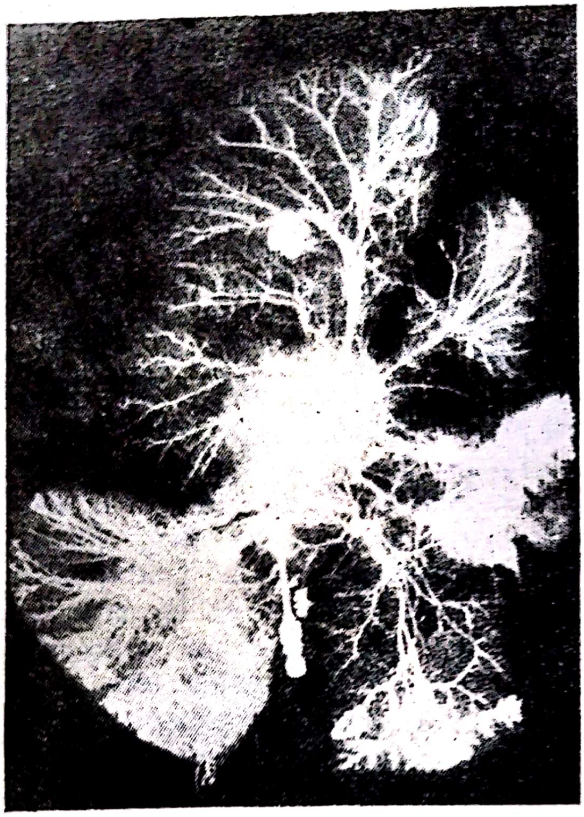


Fig. 35

Fig. 36

Fig. 35. — Arteriogramă hepatică efectuată *post-mortem* la un cîine cu transplant hepatic ortotopic (după 7 zile de la transplantare).

Shunt-urile arterio-sinusoidale apar ca niște ciorchini în jurul ramurilor arteriale, mai ales în partea de jos a acestei fotografii. Din cele 5 zone vasculare prezente aici, 3 zone au aspect ischemic [după Moore și colab. (108)].

Fig. 36. — Complexe antigen-anticorp probabile pe o celulă dintr-un homotransplant renal în eliminare, la cîine, evidențiabile prin imunoaderență:

Hematii umane și complement separat la cobai au fost puse în contact cu o suspensie de celule renale spălate. Hematiile umane apar fixate strîns de suprafața celulei renale acoperită de anticorpi. Celule similare sînt prezente și în rinichii receptorului în cursul eliminării, dar sînt absente în rinichii de cîine normal (contrast de fază × 1 200) [după Hager și colab. (69)].

În capitolul I au fost prezentate aspectele practice ale instituirii reirigării unor homotransplante de organ (rinichi, plămîn, inimă).

Cu această ocazie revenim asupra unui singur organ și anume ficatul, care poate fi socotit ca exemplu cu caracter de generalizare, dar care are în același timp și cîteva particularități. Injectarea vaselor homotransplantelor hepatice canine *post-mortem* au evidențiat zone în care umplerea arterială este absentă și zone de congestie (fig. 35) care sînt concordante cu blocajul circulației hepatice din stările de șoc la cîine (117, 171). Angiografiile homotransplantelor hepatice efectuate *in vivo* arată de asemenea trecerea substanței de contrast în parenchim, ca urmare a permeabilității exagerate a *shunt*-urilor arterio-sinusoidale sau obstrucția trombotică a unor ramuri arteriale importante. Aceste tulburări de irigație se însoțesc de necroze evidente macro- și microscopic (108). Față de celelalte organe homotransplantate, congestia provocată de blocajul circulator în ficat (171) este mai evidentă.

Scanned with OKEN Scanner

B. HISTOLOGIA ORGANELOR ŞI ŢESUTURILOR TRANSPLANTATE

Dat fiind că pînă acum posibilitatea de a menţine viabile o perioadă mai îndelungată organe şi ţesuturi homotransplantate s-a limitat la rinichi şi piele, majoritatea informaţiilor noastre despre evoluţia morfologică şi biochimică a organelor şi ţesuturilor transplantate se referă la acestea. Transplantarea altor organe, cum ar fi inima sau ficatul, a permis numai studii sporadice ale modificărilor morfologice şi biochimice care au urmat operaţiei de transplantare.

Manifestările morfologice ale eliminării homografelor, variază de la ţesut la ţesut. Acest fapt justifică prezentarea lor în parte.

1. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI RENAL

a) **Mecanismul de producere a leziunilor.** Eliminarea homografei implică, în general, distrugerea sa progresivă printr-un proces condiţionat în ultimă instanţă de mecanismele imune ale receptorului şi manifestat prin invadarea acestui ţesut de celulele sale, devenite în această circumstanţă, transportori de anticorpi (62, 68, 69, 118, 173). Prezenţa complexelor antigen-anticorp la suprafaţa celulelor sau în celulele provenind de la orice rinichi transplantat (fig. 36) şi absenţa lor în celulele rinichilor normali sau ale celor infarctizaţi pare să ofere o evidenţă morfologică semnificativă privind rolul anticorpilor în distrugerea ţesutului transplantat atît în eliminarea de tip *first set*, cît şi în aceea de tip *second set* şi rolul a cel puţin patru componente ale complementului (C′ 1, 4, 2, 3c) în acest proces de degradare, implicate dealtfel şi în procesul de fagocitoză (122) şi evidenţiabile prin reacţia de imunoaderenţă.

Merrill şi colab. (105) au descris aspecte de citoliză în limfocitele sensibilizate ale receptorilor de homografe de piele, urmate de eliminarea acestora din urmă. Pînă acum nu se ştie însă precis pe care cale ajunge informaţia despre antigenul străin la ţesuturile limfoide ale gazdei. Dausset [citat de (69)] a pus în evidenţă anticorpi în/pe trombocitele şi leucocitele provenind de la oameni care au prezentat aşa-numita boală secundară şi eliminarea homotransplantului renal. Amos (6) a observat că în cursul eliminării grefelor tumorale se produce şi liza histiocitelor gazdei, iar Gorer şi O'Gorman (67), utilizînd ca criteriu de viabilitate captarea celulară de coloranţi, au găsit că 17—22% din celulele splenice ale şoarecilor cu homografe de piele în curs de eliminare nu sînt viabile. Date suplimentare în sprijinul participării celulelor limfoide la procesul de eliminare a homotransplantelor de organe şi al degradării acestor celule în această circumstanţă au adus şi alţi autori (27, 37, 78, 88, 122, 128). În ultima vreme, limfocitelor circulante ale receptorului unui homotransplant de organe li se atribuie un rol deosebit şi în informarea ţesuturilor limfoide despre prezenţa unui antigen în organism. Aceste limfocite ar intra în contact cu celulele endoteliului vascular al homotransplantului de organe şi ar suferi acţiunea acestora (136). Argumentele aduse în sprijinul acestei ipoteze sînt: a) limfocitele mici aderă la celulele endoteliale ale capilarelor şi venulelor peritubulare (intertubulare) ale rinichiului homotransplantat încă din primele ore după operaţie (fig. 37); b) aceste celule se transformă în interiorul organului transplantat în celule pironinofile, unele avînd reticul endoplasmic, altele neavîndu-l şi intră după această transformare în fază proliferativă (fig. 38).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 37

Fig. 38

Fig. 37. — Microfotografie electronică a unui rinichi canin la două ore după homotransplantare la un receptor netratat.
Un limfocit (*L*) se află în contact strîns cu endoteliul (*E*) unui capilar peritubular (× 9 000) [după Porter (131)].

Fig. 38. — Rinichi canin la 72 de ore după homotransplantare.
Săgeata indică celule ale receptorului cu citoplasmă puternic bazofilă, care se află dispuse în strînsă vecinătate cu celulele endoteliale ale unui capilar peritubular (hematoxilină-eozină; × 400) [după Porter (131)].

Aceste limfocite cu caractere modificate are reveni pe cale limfatică sau sanguină în ţesuturile receptorului, condiţionînd prin proliferare apariţia celulelor pironinofile (bogate în acid ribonucleic) în aceste ţesuturi. După ce ar reveni pe aceleaşi căi în organul transplantat, aceste celule ar fi în stare să producă leziuni locale ale endoteliului vascular, ca urmare a reacţiei antigen-anticorp. Consecinţa imediată ar fi ruperea peretelui capilar şi pătrunderea acestor celule în interstiţiul organului transplantat, unde pot continua să prolifereze. Localizarea celulelor receptorului în vasele peritubulare ale rinichiului transplantat se poate produce ca urmare a încetinirii fluxului sanguin în această reţea capilară, ceea ce permite marginaţia limfocitelor.

Distrugerea capilarelor peritubulare poate fi invocată pentru explicarea edemului interstiţial, a hemoragiei interstiţiale şi a necrozei ischemice a tubilor proximali (88), leziuni descrise în amănunt în cele ce urmează. Această succesiune a tulburărilor este responsabilă probabil de prăbuşirea funcţională rapidă a celor mai mulţi rinichi homotransplantaţi la cîini nesupuşi vreunui tratament imunosupresor. Funcţiunea unor asemenea rinichi încetează de obicei după 2—14 zile de la operaţia de transplantare (52).

b) **Leziunile parenchimatoase.** Pînă acum nu s-a transplantat un rinichi uman la un om sănătos, cu uremie normală şi în afara oricărui tratament. Date din asemenea sursă au fost obţinute numai în experienţe pe cîini normali nesupuşi vreunui tratament imunosupresor (44, 81, 152). Trebuie menţionat că mo-

Scanned with OKEN Scanner

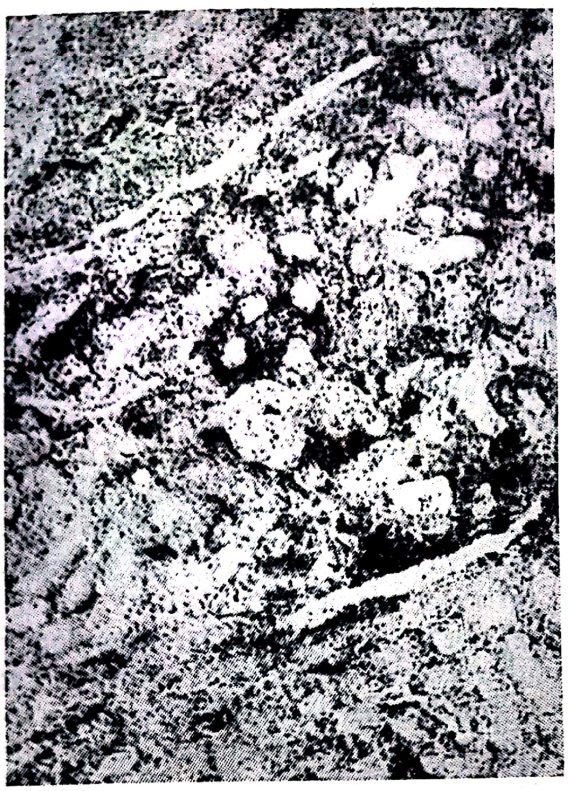


Fig. 39

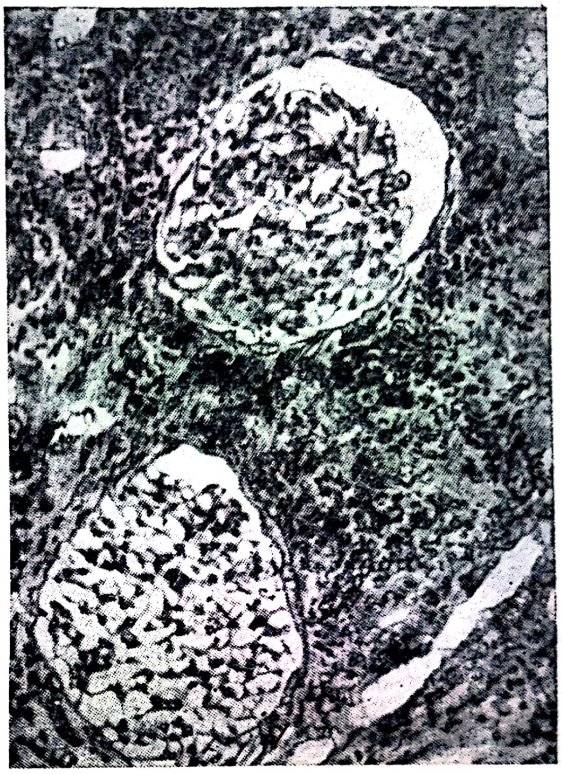


Fig. 40

Fig. 39. — Răspuns sever observat la un rinichi în eliminare de tip *second set* după sensibilizarea prealabilă a receptorului printr-un homotransplant renal de 24 de ore de aceeaşi proveniență.

Hemoragiile, infiltratul celular şi necroza prezente în țesut apar fără excepție în acest tip de eliminare a homotransplantului renal (hematoxilină-eozină; × 75). [după Nathan (116)].

Fig. 40. — Leziuni parenchimatoase de eliminare a unui homotransplant renal canin la 10 zile după operație.

Se observă hemoragii interstiţiale masive, depozite mici de hemosiderină şi necroză parenchimatoasă, cu rari nuclei de celule epiteliale tubulare persistenți. Hemoragia, depozitele de hemosiderină şi necroza maschează infiltratul celular (hematoxilină-eozină; × 140) (observații personale).

dificările morfologice ale homotransplantului primar de piele sau rinichi se deosebesc de acelea ale homotransplantelor respectiv consecutive.

În funcție de această situație, reacția tipică din parenchimul unui rinichi homotransplantat este cuprinsă între o infiltrație celulară abia perceptibilă şi o invazie leucocitară difuză şi puternică. Această diferență de intensitate a reacției parenchimatoase este determinată, aşadar, de particularitățile reacționale ale gazdei; cînd eliminarea organului transplantat este rapidă (1—3 zile), cum se întîmplă cu al doilea homotransplant renal la animale sensibilizate printr-un homotransplant anterior, provenit de la acelaşi donator (44, 52, 152), leziunile morfologice sînt mult mai severe; în acest caz, reacția imediată din parenchimul renal se întinde de la infiltrate celulare puternice, în care predomină leucocitele neutrofile, pînă la hemoragii grave şi necroze pe zone vaste cu blocarea circulației sanguine în aceste zone (122). Leziunile necrotice tubulare se însoțesc

Scanned with OKEN Scanner

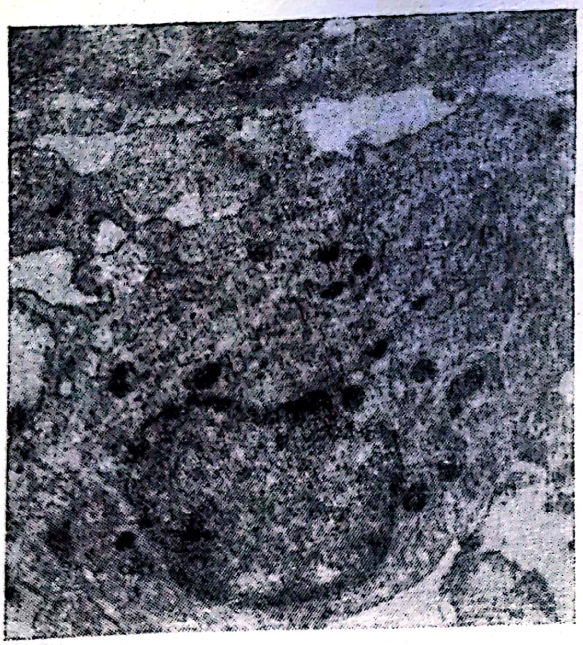


Fig. 41. — Microfotografie electronică a unui homotransplant de rinichi canin după 96 de ore de la transplantare.

Celulă infiltrantă cu *reticulum endoplasmic* bine dezvoltat, plasată în *interstitium* (× 6 000) [după Porter (131)].

de apariţia unor depozite proteice, de sînge şi celule endoteliale detaşate în lumenul tubular. Adesea se întîlnesc mici focare de infarct în corticala rinichiului. Caracterul dominant al leziunilor renale produse de eliminarea rapidă a organului este hemoragia interstiţială. Glomerulii prezintă necroză fibrinoidă în unele din ansele sale capilare, la fel ca în capilarele peritubulare, arteriolele aferente şi arterele interlobulare. Aceste leziuni avansate din cursul eliminării homotransplantului renal, în afara oricărui tratament imunosupresor, sînt ilustrate în fig. 39 şi 40. Ele nu sînt condiţionate de modul în care se face sensibilizarea; modificări morfologice identice ale rinichiului transplantat se produc fie că sensibilizarea s-a realizat prin transplantare prealabilă de piele sau splină (44, 152), fie că s-a realizat prin circulaţie încrucişată cu donatorul (53). Este interesant de semnalat că Altman (4) a reprodus aceste modificări morfologice, perfuzînd un homotransplant renal cu plasmă de la un animal hiperimunizat faţă de donatorul de rinichi.

Majoritatea celulelor care infiltrează homotransplantul renal canin sînt pironinofile. Potrivit structurii lor ultramicroscopice, ele se pot repartiza în trei grupe mari (134, 136): a) celule cu reticul endoplasmic foarte dezvoltat (fig. 41), care par să aparţină seriilor de celule plasmocitare. Aceste celule sînt mari, cu nucleul central sau uşor excentric, în care cromatina este aranjată într-un dispozitiv lax, difuz. Nucleolii nu se pot pune totdeauna în evidenţă. Citoplasma acestor celule este de obicei abundentă, uneori este însă redusă. Caracterul lor dominant este prezenţa unui reticul endoplasmic foarte bine dezvoltat. Mitocondriile acestor celule sînt destul de numeroase şi mari (88); b) celule cu reticul endoplasmic redus sau fără reticul endoplasmic, asemănătoare fie limfocitelor mari, fie histiocitelor. Aceste celule sînt mai mari decît limfocitele mici. Nucleii lor au un contur uşor crenelat şi conţin adesea cîte un nucleol mare. Citoplasma abundentă a acestor celule prezintă mulţi ribozomi liberi şi cîteva vacuole. Aceste celule poartă urme evidente de micropinocitoză. Caracterul lor dominant este lipsa unui reticul endoplasmic, care este înlocuit uneori cu cîteva elemente ergastoplasmice. Mitocondriile din citoplasma acestor celule sînt mari şi numeroase (fig. 42). Aceste celule sînt asemănătoare acelora descrise de Binet şi Mathé (18) în ganglionii limfatici care drenează o homografă de piele şi de Wiener şi colab. (180) în însăşi homografa de piele. Prezenţa unui mare număr de ribozomi în citoplasma a numeroase celule din aceste două grupe principale explică de ce un procent ridicat de infiltrate interstiţiale renale

Scanned with OKEN Scanner

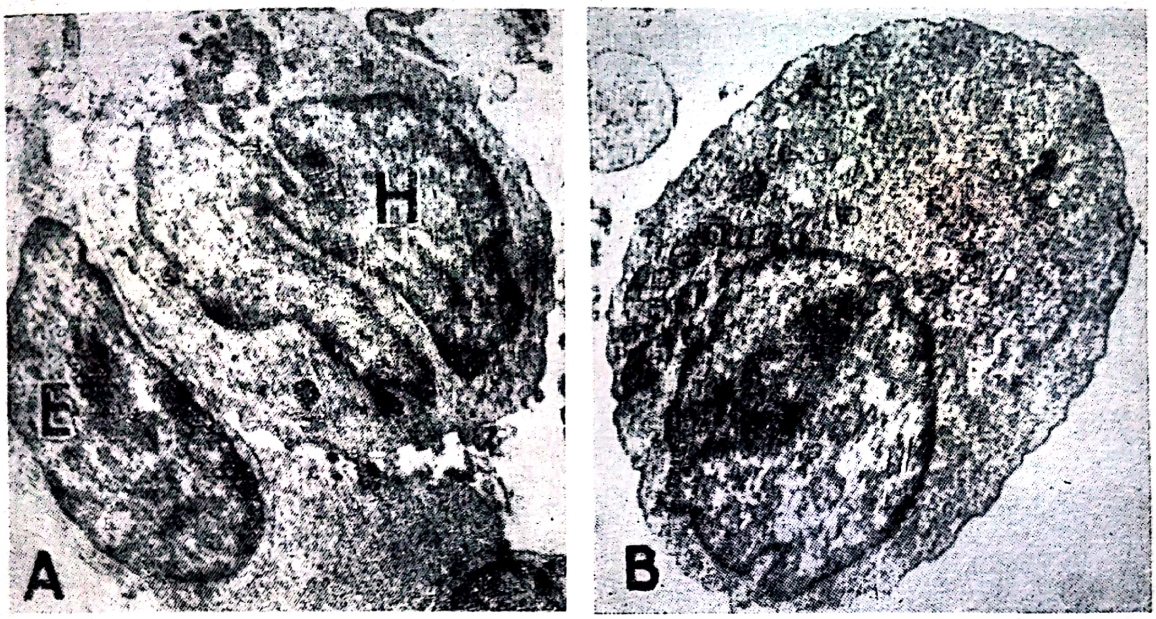


Fig. 42. —

A — Microfotografie electronică a unui homotransplant de rinichi canin după 48 de ore de la transplantare. O celulă infiltrantă de tip histiocitar (*H*) se află într-un capilar peritubular, lipită de o celulă endotelială; *B* — microfotografia electronică a unui homotransplant de rinichi canin după 72 de ore de la transplantare. O celulă infiltrantă de tip limfoid se află într-un capilar peritubular; citoplasma conține puțini ribozomi liberi și nu are *reticulum endoplasmic* (× 6 000) [după Porter (131)].

studiate la 48 de ore după transplantarea rinichiului sînt pironinofile; c) limfocite mici, puține la număr, cu nucleul mare, constituit din cromatină omogenă și prezentînd un contur profund crenelat. Citoplasma este puțin abundentă și conține ribozomi liberi și cîteva mitocondrii, cu dimensiuni mai mici decît acelea din celelalte celule infiltrante.

După 24 de ore de la operația de transplantare a rinichiului, limfocitele mici aderă de celulele endoteliale ale capilarelor și venulelor peritubulare din corticală și partea externă a medularei organului. Celulele mari, cu sau fără reticul endoplasmic, își fac apariția în parenchimul rinichiului homotransplantat abia după 48 de ore. Aderența acestor ultime celule la celulele endoteliale ale capilarelor rinichiului este urmată de distrugerea peretelui capilar. Kountz și colab. (88) și Porter și colab. (131, 136) au reușit să evidențieze stabilirea temporară a unei continuități citoplasmatice evidente între celulele infiltrante și celulele endoteliale capilare (fig. 43). Porțiunile excrescente ale celulelor endoteliale se retractă parțial, celulele se rotunjesc și se separă una de cealaltă. Ca urmare, plasma și celulele receptorului pătrund în interstițiu (fig. 44). În medie, cam 4% din infiltratul celular din homotransplantul renal încorporează după 4 zile de la transplantare ^{3}H-timidină în primele 30 de minute după ce izotopul a fost injectat în artera renală (fig. 45), ceea ce arată că aceste celule sintetizează în mod intens ADN și, probabil, pot chiar să se dividă (47, 134).

Așadar, se poate presupune că celule cu ultrastructura celulelor limfoide și a plasmocitelor primitive pătrund în parenchimul homotransplantului renal prin efracția pereților capilarelor peritubulare.

S-a semnalat o considerabilă variație a numărului celulelor infiltrante prezente în diferite homografe, la un anumit moment după transplantare. Pe mă-

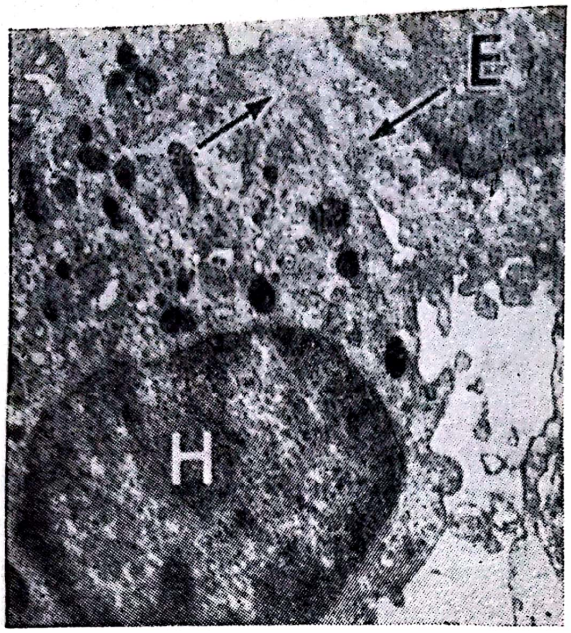


Fig. 43. — Microfotografie electronică a unui homotransplant de rinichi canin la 48 de ore după transplantare.

O celulă infiltrantă (*H*) este în contact cu o celulă endotelială (*E*) dintr-un capilar peritubular. Săgeţile arată două puncte în care s-a produs ruptura membranelor şi stabilirea continuităţii citoplasmatice între celule (× 12 000) [după Porter (131)].

Fig. 44

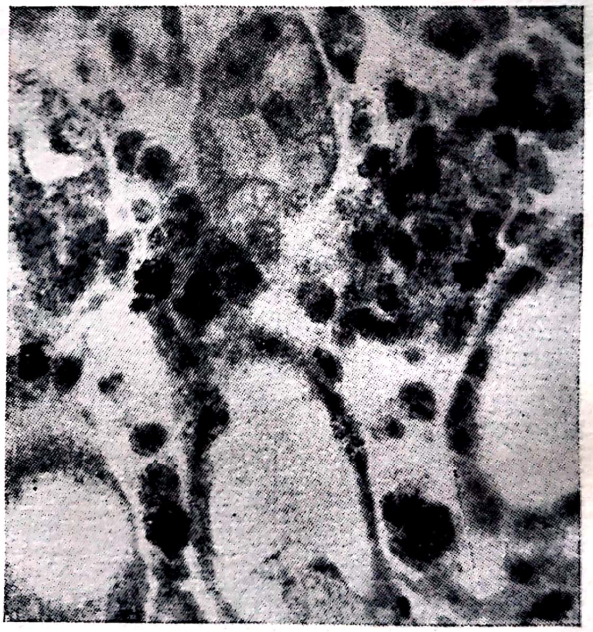


Fig. 45

Fig.44. — Microfotografia electronică a unui homotransplant de rinichi canin la 72 de ore după transplantare.

O celulă infiltrantă (*H*) împreună cu plasma au pătruns în *interstitium* printr-o ruptură a peretelui capilar peritubular (săgeţi.) (× 4 000) [după Porter (131)].

Fig. 45. — Autoradiografia unui rinichi canin la 4 zile după homotransplantare şi 30 de minute după injectarea ^{3}H-timidinei în artera renală.

Numeroase celule infiltrante în *interstitium* sînt marcate puternic. Cîteva celule epiteliale tubulare în regenerare au captat de asemenea izotopul (hematoxilină-eozină; × 300) [după Porter (131)].

Scanned with OKEN Scanner

sură ce perioada postoperatorie se mărește, celulele care infiltrează rinichiul transplantat au ultrastructura plasmocitelor mature.

În stadiile terminale se produce un puternic edem al țesutului, iar în infiltratul celular apar leucocite polimorfonucleare și macrofage.

Distrugerea progresivă a capilarelor peritubulare și a venulelor, cu acumularea unor mari cantități de lichid și celule în interstițiu, produce scăderea debitului sanguin total. Perfuzia tubulară devine neadecvată și acest fapt conduce la necroza celulelor tubilor contorți proximali (fig. 46) și la oligurie (88).

c) **Leziuni vasculare în parenchimul rinichiului transplantat.** Tumefierea celulelor endoteliale arteriale este frecventă în rinichiul homotransplantat. Micșorarea lumenului arteriolar și îngroșarea intimei arteriale sînt observații comune în acest caz. Depozitele de fibrină, celule pironinofile și trombocite de pe endoteliul arterelor interlobulare și al arterelor mari (fig. 47 și 48), îngroșarea fibroasă a intimei arteriale (fig. 49 și 50) și rupturi în *lamina elastica* internă (fig. 51 și 52) sînt aspecte obișnuite ale rinichiului canin sau uman homotransplantat după o supraviețuire mai îndelungată de 60—70 de zile sub tratament cu substanțe imunosupresoare (46, 52). Asemenea supraviețuiri, în afara unui tratament imunosupresor, sînt cu totul excepționale și se datoresc probabil compatibilității genetice întîmplătoare a receptorului și donatorului (189). În cazuri de acest fel se întîlnesc leziuni similare acelora descrise sub tratament imunosupresor: atrofie tubulară, fibroză interstițială, infiltrație celulară redusă, obliterare fibroasă a numeroase capilare peritubulare, arteriole și artere mici și îngroșare fibroasă a intimei în numeroase vase mari (fig. 53 și 54). Caracterul dominant al acestor leziuni este polimorfismul lor, ca urmare a tranziției între leziunea fibrinoasă și leziunea fibroasă.

Leziunile vasculare sînt frecvente și severe la nivelul ramificațiilor arteriale și se agravează pe măsură ce calibrul arterelor se micșorează (40). În rinichii homotransplantați, cu o supraviețuire de lungă durată, se dezvoltă o fibroză periglomerulară tipică, membranele bazale ale capilarelor glomerulare se îngroașă, însăși capsula glomerulară se fibrozează, se produce o atrofie tubulară întinsă, iar fibroza interstițială o însoțește totdeauna.

La om au fost puse de asemenea în evidență leziuni arteriale obliterative tardive (136, 137). Leziunile precoce ale rinichiului uman homotransplantat (la 6—7 zile de la transplantare) sînt edemul interstițial și infiltrația celulară în focare, constînd — așa cum s-a arătat mai înainte pentru rinichiul canin homotransplantat — din limfocite mici, puține plasmocite și chiar mai puține celule pironinofile mari (87, 134, 181). Cele mai evidente focare infiltrative se semnalează în acest moment al evoluției homotransplantului renal la nivelul capilarelor peritubulare; necroza fibrinoidă lipsește sau se manifestă foarte discret, iar tubii sînt normali. Cînd rinichiul evoluează spre eliminare, în 2—3 săptămîni se produc, chiar sub tratament cu substanțe imunosupresoare, modificări vasculare brutale: tumefierea celulelor endoteliale arteriolare pînă la obstrucția lumenului vascular, necroză fibrinoidă întinsă a tunicii medii a pereților arteriolari, tromboză arteriolară și arterială, rupturi ale laminei elastice interne, infiltrație puternică în jurul capilarelor peritubulare cu limfocite și celule pironinofile, edematierea interstițiului, hemoragii interstițiale cu insule de fibrină, necroza tubilor proximali cu depunerea unor detritusuri celulare în interiorul lor, infarc-

Scanned with OKEN Scanner

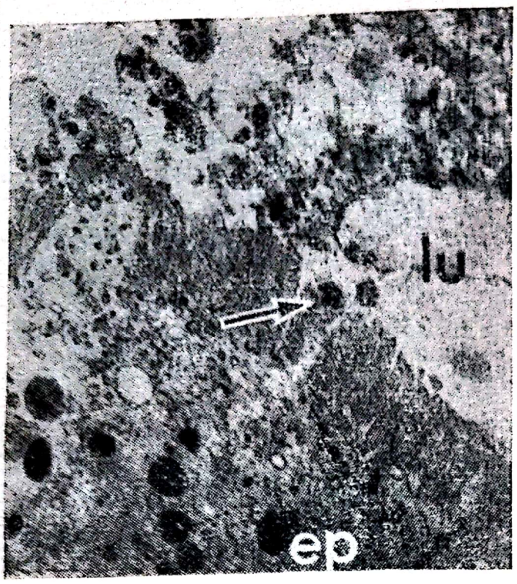


Fig. 46. — Microfotografie electronică a unui homotransplant de rinichi canin după 96 de ore de la transplantare. Celulele epiteliale (*ep*) care căptuşesc prima parte a unui tub contort proximal sînt distruse. Organitele celulare (săgeata) se află în lumenul tubului (*lu*) (× 4 000) [după Porter (131)].

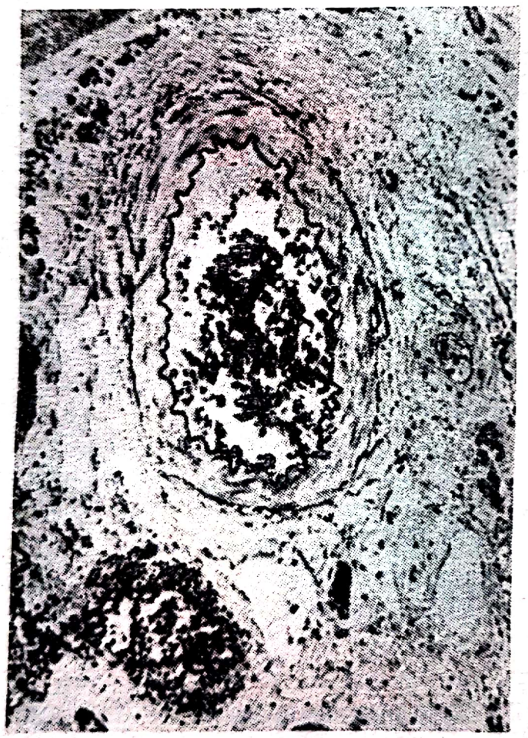


Fig. 47

Fig. 48

Fig. 47. — Homotransplant renal canin, care a funcţionat 303 zile sub tratament cu imuran. Imaginea unei artere interlobulare evidenţiază îngroşarea fibroasă a intimei şi infiltrarea sa cu trombocite; lamina elastică internă apare intactă (Weigert-van Gieson; × 250) [după Porter şi colab. (136)].

Fig. 48. — Homotransplant renal uman; biopsie la 44 de zile. O arteră interlobulară prezintă necroză fibrinoidă a peretului cu îngroşare fibroasă a intimei şi infiltrarea sa cu trombocite (hematoxilină-eozină; × 350) [după Porter şi colab. (136)].

Scanned with OKEN Scanner

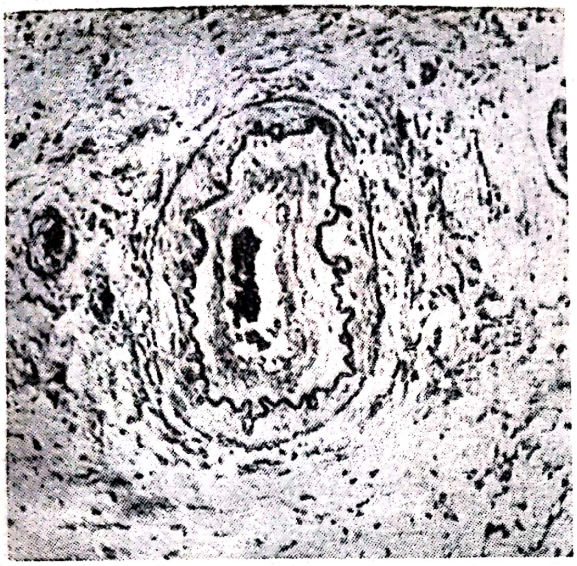


Fig. 49

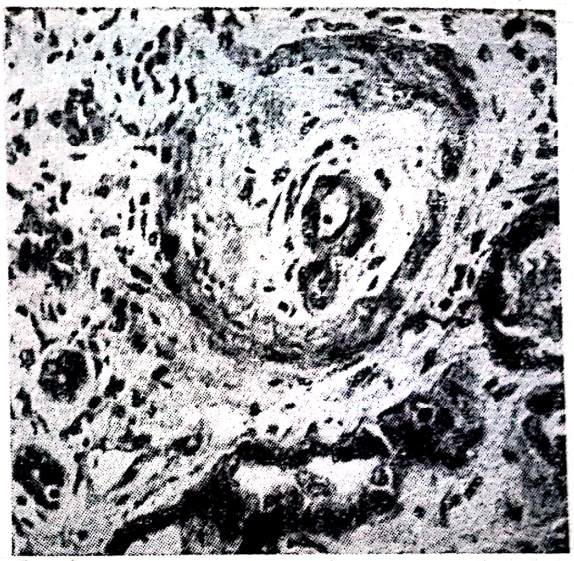


Fig. 50

Fig. 49. — Homotransplant renal canin care a funcţionat 300 de zile sub tratament cu imuran şi actinomicină C.

Se observă o arteră interlobulară care prezintă îngroşarea fibroasă a intimei; de asemenea se pot observa atrofia tubulară înaintată şi fibroza interstiţială (Weigert-van Gieson; × 250) [după Porter şi colab. (136)].

Fig. 50. — Homotransplant renal uman la 54 de zile.

Se poate observa îngroşarea fibroasă a intimei unei artere interlobulare (hematoxilină-eozină; × 400) [după Porter şi colab. (136)].

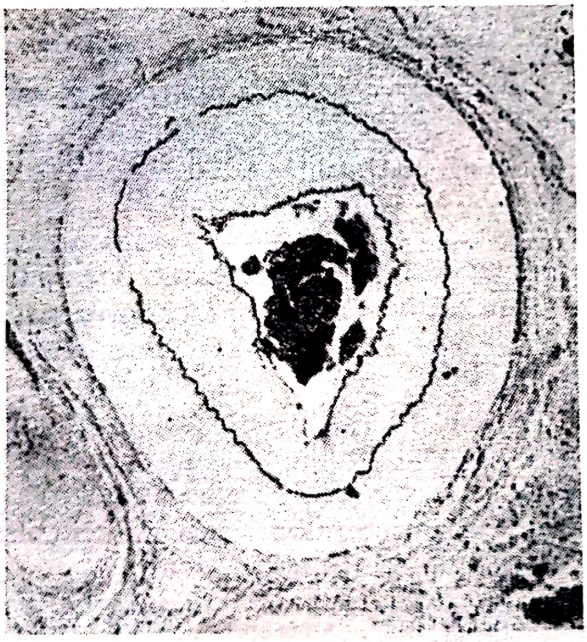


Fig. 51

Fig. 52

Fig. 51. — Homotransplant renal canin care a funcţionat 113 zile sub tratament cu 6 (2,4-dinitrofenil)-tiopurină şi actinomicină C.

Se poate vedea îngroşarea fibroasă a unei artere interlobulare şi ruptura laminei elastice interne a acestei artere (Weigert-van Gieson; × 40) [după Porter şi colab. (136)].

Fig. 52. — Homotransplant renal uman la 54 de zile.

Se pot observa îngroşarea fibroasă a intimei cu hipertrofia laminei elastice interne şi ruptura acesteia din urmă (Weigert-van Gieson; × 40) [după Porter şi colab. (136)].

Scanned with OKEN Scanner

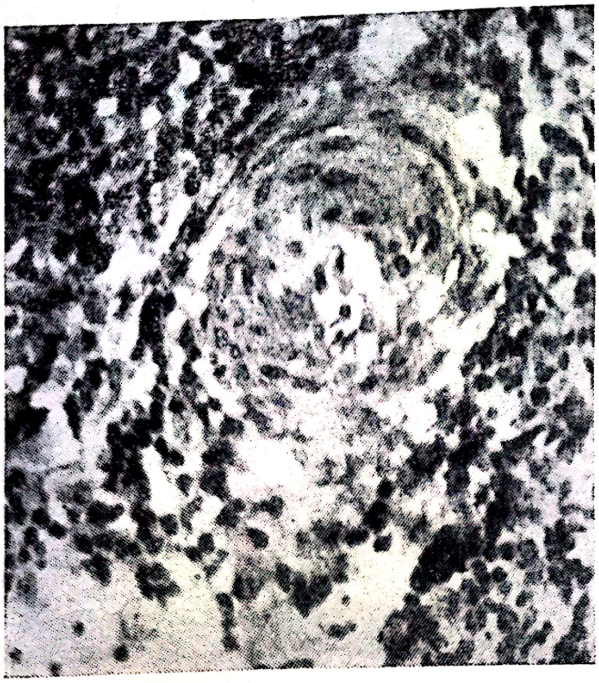


Fig. 53

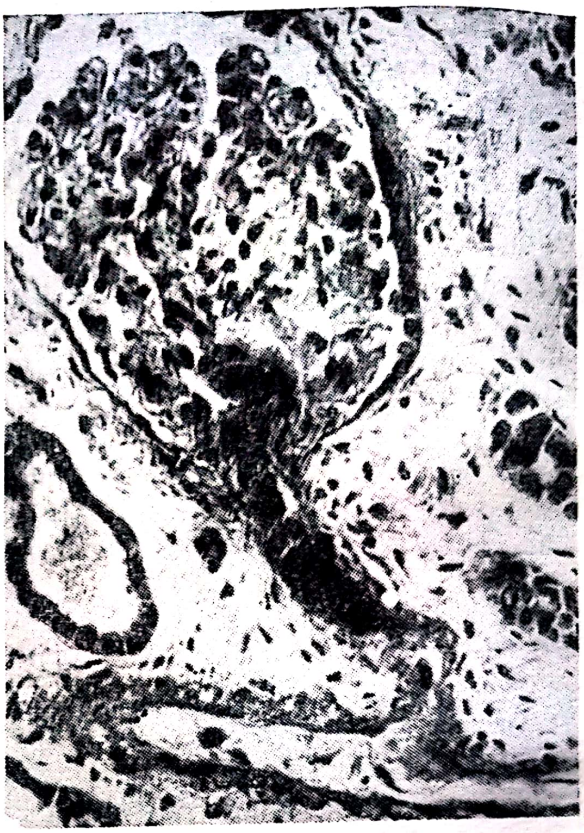


Fig. 54 →

Fig. 53. — Homotransplant renal canin, netratat, după 30 de zile de la transplantare.
Se vede o arteriolă, cu îngroşarea fibroasă obliterativă a intimei (hematoxilină-eozină; × 300) [după Porter (131)].

Fig. 54. — Leziuni vasculare într-un rinichi canin homotransplantat, care a funcţionat 17 zile sub tratament cu 6 (2,4-dinitrofenil)-tiopurină.
Se poate vedea necroza fibrinoidă în peretele unei artere interlobulare şi al unei arteriole aferente şi obliterarea lor (hematoxilină-eozină; × 600) [după Porter şi colab. (136)].

tizare glomerulară şi îngroşarea membranelor bazale ale capsulei glomerulare (51, 133, 135). Aşadar, în cursul dezvoltării procesului de eliminare, leziunile rinichiului uman sînt identice cu leziunile rinichiului canin homotransplantat.

Cînd distrugerea homotransplantului renal este însă întîrziată prin tratament imunosupresor, incidenţa necrozei fibrinoide a pereţilor arteriolari şi arteriali creşte în mod impresionant (125, 131, 136, 152). Uneori, necroza fibrinoidă a vaselor domină aspectul histologic al homotransplantului, în timp ce infiltraţia celulară este minimă. În această circumstanţă este greu de admis că distrugerea peretelui vascular se datoreşte în întregime anticorpilor legaţi de celulele invadatoare ale receptorului. Este posibil ca organul transplantat să inducă producţia de anticorpi circulanţi în organismul-gazdă, la fel ca şi producţia de anticorpi fixaţi pe celule şi că, datorită celor dintîi, s-ar dezvolta necroza fibrinoidă a pereţilor vasculari. Există importante dovezi asupra proliferării considerabile după 6—7 zile de la transplantarea rinichiului a plasmocitelor în ţesuturile limfatice ale organismului receptor şi nu este greu de a se imagina că unele celule fiice ale celulelor originale, care au colonizat ţesuturile limfatice, s-au diferenţiat şi au ajuns să elaboreze ele însele anticorpi. Mai mult, recent, Horowitz şi colab. (78), folosind o metodă cu anticorpi fluorescenţi, au arătat că în media arterelor interlobulare şi a arteriolelor aferente apar, după aproxi-

Scanned with OKEN Scanner

mativ 3 zile de la transplantare, acumulări minuscule de γ-globuline, neaderente de celule; în următoarele 3 zile, pereţii a numeroase vase prezintă în întregime fluorescenţa γ-globulinelor. γ-Globulina este solubilă în tampon acid şi fixează complementul *in vitro*, ceea ce sugerează că ea face parte dintr-un complex antigen-anticorp. Autotransplantele nu prezintă o asemenea fluorescenţă, chiar după ce au fost supuse în mod deliberat hipoxiei. De asemenea, Altman şi Simonsen (5) au pus în evidenţă anticorpi citotoxici în pereţii vasculari ai homotransplantului renal, în perioada de la 7 la 14 zile după transplantare.

Leziunile prezentate mai sus sînt progresive şi condiţionează aspectul macroscopic al rinichiului uman eliminat: edem, infarctizare hemoragică, tromboze ale arterelor arcuate şi interlobulare şi ale venei renale principale (mai rar se observă tromboza arterei renale principale) şi blocarea ureterului cu cristale de oxalat de calciu şi detritusuri celulare.

d) **Aspecte morfologice ale organelor transplantate la receptori cu reactivitatea modificată.** Uremia, incompatibilitatea de grup sanguin între receptor şi donator, tratamentul cu substanţe imunosupresoare şi iradierea organismului reprezintă fiecare în parte un factor cu rol important în modificarea evoluţiei procesului de eliminare şi a leziunilor morfologice respective. Asupra acestei probleme se va insista pentru implicaţiile clinice pe care ea le are.

Uremia. Homografele de rinichi la cîini sau oameni, care se află în insuficienţă renală acută, se elimină în 15—23 de zile (99, 106). Ele prezintă aceleaşi modificări patologice ca şi homografele renale la cîinii normali, dar infiltraţia celulară începe mai tîrziu, leziunile vasculare fiind mai frecvente.

Cînd rinichii sînt transplantaţi la bolnavi cu insuficienţă renală cronică, prelungirea supravieţuirii lor poate fi considerabilă. Într-un asemenea caz, homotransplantul renal a continuat să excrete urină 176 de zile (83). La capătul acestui interval, pe lîngă atrofie tubulară, fibroză interstiţială şi focare de infiltraţie plasmocitară, au fost evidenţiate numeroase ocluzii arteriale prin îngroşarea fibroasă a intimei. Depozite lipidice însemnate au fost observate în partea externă a intimei îngroşate, media a fost atrofică, iar lamina elastică internă fragmentată.

Incompatibilitatea de grup sanguin între receptor şi donator. Rinichii de la donatori de grup sanguin A, B şi AB, transplantaţi la receptori de grup sanguin incompatibil, încetează imediat să funcţioneze (158). La cîteva minute după transplantare, cînd rinichiul a început să fie irigat, devine cianotic, turgescent şi anuric. Dacă se fac examene histologice în primele 3 ore după transplantare, se constată distensiunea arteriolelor aferente, blocarea capilarelor glomerulare cu hematii aglutinate şi hemoragii interstiţiale la nivelul joncţiunii cortico-medulare. Aceste modificări au fost puse pe seama efectului anticorpilor aglutinanţi preexistenţi, aflaţi în plasma receptorului, asupra vaselor rinichiului transplantat (131). Totuşi, Hume şi colab. (82) au transplantat un rinichi de la un donator de grup sanguin B la un receptor de grup sanguin A, fără ca în evoluţia imediată a transplantului să se producă tulburări, rinichiul transplantat fiind în prealabil spălat de sîngele donatorului. S-a înregistrat însă imediat după operaţie o scădere a titrului anti-B de la 1/1 024 la 1/33 în sîngele receptorului, iar la 24 de ore după transplantare, anticorpii anti-B nu au mai putut

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

şi detectaţi. Rinichiul a funcţionat excepţional 6 zile, dar după 14 zile a trebuit să fie înlăturat, urmînd a se efectua o a doua transplantare. Morfologic, rinichiul a fost total infarctizat, dar nu a prezentat turgescenţa, edemul interstiţial şi infiltraţia limfoidă, caracteristice procesului de eliminare. Cum în celulele endoteliale şi parenchimatoase renale există antigen A şi B (65), este de presupus că după transplantarea acestui rinichi, anticorpii serici anti-B au fost fixaţi de antigenele anti-B din celulele endoteliale (ceea ce explică scăderea titrului anti-B în sîngele receptorului), unde a avut loc reacţia antigen-anticorp, care a dus mai întîi la trombozarea capilarelor şi arteriolelor din cortextul renal şi apoi, progresiv, a vaselor mari pînă la artera renală. De aceea este preferabil să se utilizeze donatori de organe al căror grup sanguin este compatibil cu acela al receptorului (tabelul 26), cu toate că uneori se poate întîmpla ca un rinichi de la un donator de grup sanguin incompatibil să funcţioneze un timp oarecare. Observaţiile ocazionate lui Hume şi colab. (82) de acest caz sînt contrare acelora mai vechi ale lui Starzl şi colab. (156, 160), dar sînt concordante cu noul lor punct de vedere (157, 158).

Tabelul 26

Condiţiile grupurilor sanguine pentru transplantarea organelor

Grupul sanguin al receptorului	Grupul sanguin al donatorului
AB	A, B, AB şi O
O	O
A	A, O
B	B, O

Tratamentul cu substanţe imunosupresoare. Majoritatea rinichilor transplantaţi, trataţi, chiar şi aceia care se schimbă între gemeni dizigoţi, trec printr-unul sau mai multe episoade de eliminare, care pot fi jugulate sau pot să se desăvîrşească. Aceste episoade se produc adesea în primele 2 săptămîni după transplantare. Informaţiile actuale despre modificările morfologice ale rinichilor în aceste episoade timpurii de eliminare sînt reduse. Porter (131) citează cazul unui bolnav care a murit la 8 zile după operaţie, ca urmare a reacţiei la grefă, la care s-au găsit infiltrate cu celule limfoide şi pironinofile şi leziuni ale capilarelor peritubulare şi ale tubilor proximali; nu s-au găsit leziuni ale arterelor şi arteriolelor renale.

Dacă eliminarea rinichiului este întîrziată mai mult, în cursul ei celulele endoteliale care căptuşesc arteriolele aferente se tumefiază, γ-globulinele îşi fac apariţia în pereţii arteriolari şi arteriali şi se produce de obicei necroză fibrinoidă, în focare, în pereţii acestor vase (86, 136). Procesul necrotic se extinde în mod frecvent de la arteriole la capilarele glomerulare. Edemul interstiţial şi infiltratul celular sînt prezente. Deşi infiltratul celular poate fi considerabil, în unele cazuri este surprinzător de redus sau poate să lipsească (131).

Dacă sindromul clinic al eliminării persistă, necroza fibrinoidă poate afecta pereţii numeroaselor artere interlobulare (86), unde se pot observa rupturi ale laminei elastice interne. Depozite de trombocite şi fibrină se dispun pe intima vasculară în *amonte* de leziunea parietală, iar unele din arteriolele afectate se obstruează treptat prin trombus.

Un tratament imunosupresor prompt înlătură deseori episodul distructiv; funcţia renală începe să se îmbunătăţească, iar biopsiile renale arată că tumefierea celulelor endoteliale se reduce şi că extinderea leziunilor de necroză fibri-

noidă încetează (113, 136). Unele depozite de fibrină și trombocite sînt acoperite treptat de endoteliu și sînt încorporate în intima vasului, fiind ulterior înlocuite de țesut fibros. De obicei, în acest strat, aproape de lamina elastică internă, se găsesc macrofage încărcate cu grăsime. În cursul regresiunii leziunilor, zonele lezate ale mediei devin atrofice, iar unele rupturi ale laminei elastice interne nu se mai repară (fig. 51).

La bolnavii care au murit în cursul eliminării transplantului renal, parenchimul renal prezintă leziuni combinate, condiționate mai ales de durata episodului distructiv și eficiența tratamentului. La o serie de 15 asemenea bolnavi, urmăriți de Porter și colab. (131), rinichii transplantați au fost măriți de volum din cauza edemului interstițial și au prezentat hemoragii petețiale. Infiltrația celulară a fost prezentă la 87% din cazuri, leziunile necrotice vasculare la 80%, leziunile capilarelor peritubulare la 67%, depozitele de fibrină și trombocite din intima vaselor la 60%, îngroșarea fibroasă a intimei la 53%, rupturi ale laminei elastice interne la 40%, iar tumefierea celulelor endoteliale ale arteriolelor la 40%. Modificări vasculare similare s-au întîlnit în numeroase alte homotransplante renale umane (46, 57, 130) și canine tratate (138). Limfocitele se găsesc numai ocazional în tubii rinichilor homotransplantați aflați în curs de eliminare, chiar dacă un mare număr de asemenea celule apar în urină în această perioadă (85). Edemul, infiltrația celulară și leziunile vasculare ale pereților bazinetului și ureterului se însoțesc adesea de infarctizare în focare. Aceste zone de infarctizare pot fi sediul unor perforații, dacă ureterul se obstruează cu detritus celular în cursul fazei de eliminare (131).

Modificările morfologice din homotransplantele renale care au supraviețuit unui episod de eliminare sînt deosebit de interesante. Dacă leziunile arteriale obliterative au fost intense, atunci cea mai mare parte din homotransplantele renale, care și-au recăpătat funcția după un asemenea episod, pot deveni insuficiente în cîțiva ani din cauza leziunilor ischemice (îngroșarea intimei arterelor interlobulare, atrofie tubulară, fibroză interstițială, infiltrație celulară slabă sau moderată etc.) și a hipertensiunii arteriale consecutive.

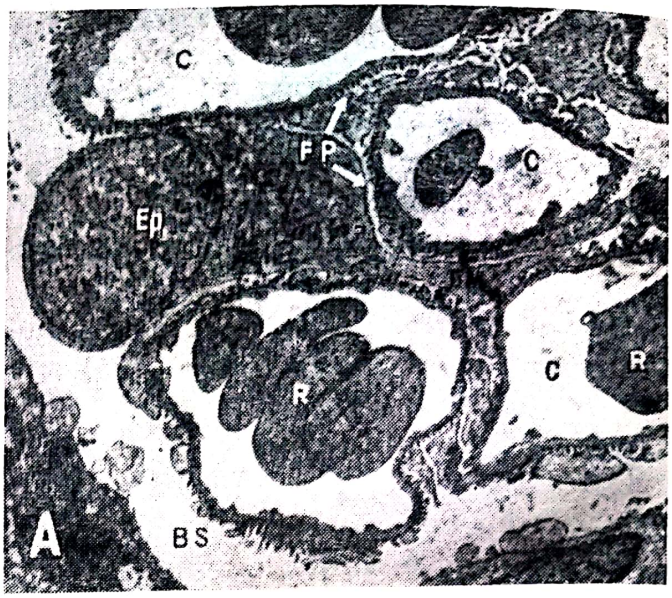
Tratamentul cu radiații ionizante. Homotransplantele renale supraviețuiesc un timp relativ lung după iradierea totală a organismului receptorului cu doze subletale. Edemul interstițial, infiltrația celulară, necroza pereților vasculari și leziunile arteriale obliterative se întîlnesc frecvent în homotransplantele renale tratate cu această metodă (46, 91). Numeroase homografe renale prezintă, totuși, largi sîngerări interstițiale (73, 120), acest tablou hemoragic dominant neîntîlnindu-se cînd se asociază alte forme de tratament.

e) **Leziunile glomerulonefritice ale transplantului renal.** Uneori, în proporție mică, rinichii umani sau canini prezintă leziuni glomerulare după transplantare la receptori cu reactivitate modificată de uremie, substanțe imunosupresoare și radiații (72, 90, 133, 136, 187, 188). Modificarea patologică principală este îngroșarea membranelor bazale ale capilarelor glomerulare, întovărășită uneori de hiperplazia celulelor endoteliale și formarea unor excrescențe în lumenul capilar (71, 112, 188). În figura 55 se pot vedea asemenea leziuni. În multe din cazurile în care nefrita glomerulară membranoasă a complicat evoluția

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 55. — Modificări glomerulare la un homotransplant renal canin după 735 de zile de la transplantare.

Se observă îngroşarea membranelor bazale ale capilarelor glomerulare şi hiperplazia celulelor endoteliale (coloraţie Schiff, × 200) [după Zukoski şi Ende (188)].



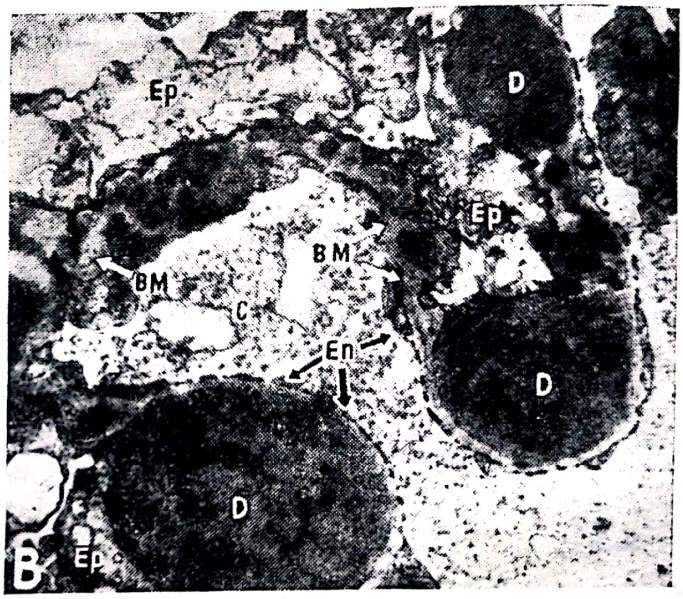


Fig. 56. — *A* — Imagine electronooptică a capilarelor glomerulare normale la iepure.

Se observă membranele bazale subţiri şi uniforme (*BM*), capilarele permeabile (*C*), care conţin eritrocite (*R*), celulele epiteliale (*Ep*). care sînt legate de membranele bazale prin punţi mici (*FP*) şi spaţiul Bowman (× 4 700); *B* — imagine electronooptică a glomerulelor unor iepuri cu nefrită glomerulară membranoasă. Se observă depozite dense (*D*) de-a lungul membranelor bazale glomerulare (*BM*). Aceste depozite apar în unele locuri unite cu membrana bazală, iar în alte locuri separate de ea. Ele au o structură densă şi sînt în mod evident demarcate de citoplasma celulelor epiteliale (*Ep*), care nu mai dispune de punţi de legătură cu membrana bazală. Lumenul capilar (*C*) este obstruat, iar citoplasma celulelor endoteliale (*En*) este relativ normală (× 13 650) [după Dixon (49)].

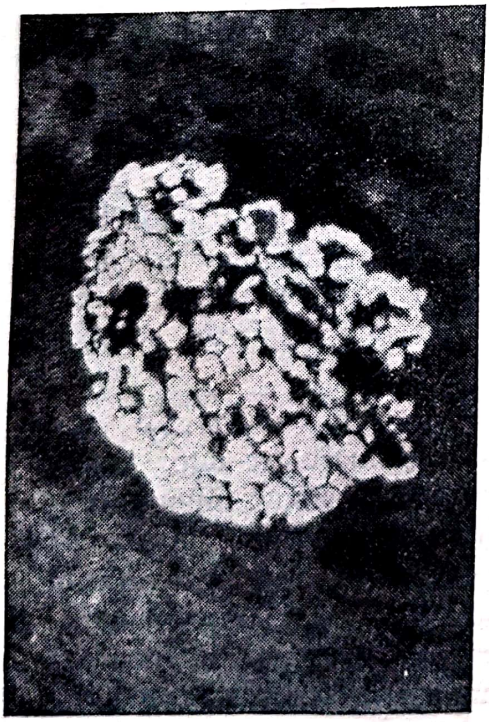


Fig. 57. — Microfotografie în fluorescenţă a unui glomerul impregnat cu anticorpi fluorescenţi anti-ASB la un iepure care a primit zilnic ASB.

Pereţii capilarelor glomerulului sînt conturaţi de granule puternic fluorescente (× 300) [după Dixon (49)].

Scanned with OKEN Scanner

unei homografe renale s-a incriminat răspunsul gazdei la grefă şi s-a presupus că modificările capilare semnalate s-ar datori formării şi fixării în aceste zone a complexelor antigen-anticorp. Dixon (49) a raportat dezvoltarea nefritei glomerulare membranoase la iepuri la cîteva luni după administrarea unor complexe antigen-anticorp. El a constatat de asemenea că şi în acest caz, îngroşarea membranei bazale se însoţeşte de inflamaţii şi proliferarea celulelor epiteliale şi endoteliale glomerulare. În imagini electronooptice (fig. 56 *A* şi *B*) se observă că la această îngroşare a membranei bazale contribuie prezenţa unor depozite dense pe *lamina densa*, în partea ei epitelială. Localizarea acestor depozite corespunde precis distribuţiei antigenelor şi anticorpilor, vizualizaţi prin metode imunohistochimice (fig. 57). Discutînd etiologia acestui sindrom, Allen (3) menţionează, pe baza unor studii microscopice, că asemenea leziuni pot fi produse şi de terapia cu cortizon, raze Röntgen, azotiperită, 6-MP, penicilină şi alte medicamente. Hume şi colab. (83) şi Porter (130) sînt de părere că în unele cazuri glomerulonefrita Ellis de tipul I, care s-a dezvoltat progresiv şi rapid la gazdă, înainte de nefrectomie, poate afecta şi rinichiul transplantat. Murray şi colab. (110) au arătat că din 32 de rinichi homotransplantaţi între gemeni, la cel puţin 5 dintre receptorii care au suferit de glomerulonefrită înainte de transplantare s-au produs leziuni similare în rinichiul transplantat.

2. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI CARDIAC

Studii histologice ale homotransplantelor de inimă netratate cu substanţe imunosupresoare au arătat că în perioada postoperatorie de 7 zile se produce o necroză difuză, marcată, a miocardului, cu pierderea arhitecturii sale (fig. 58). La animalele tratate cu substanţe imunosupresoare, structura miocardului se conservă o perioadă de aproximativ 30 de zile. În această ultimă împrejurare, leziunea cea mai evidentă este hiperplazia endoteliului, care are ca urmare îngustarea pronunţată a lumenului vaselor mici ale miocardului (142).

La şobolani cu homotransplant cardiac heterotopic s-a constatat că în primele 48 de ore, leziunile miocardului transplantat nu se deosebesc de acelea ale unui autotransplant cardiac. Aceste leziuni se produc mai ales în *epicardium* şi sînt puse pe seama manipulării inimii în timpul transplantării (1). Semnele specifice eliminării acestui organ apar după 3 zile de la operaţie. Infiltratul celular cu mononucleare se dispune în grefele cardiace primare, în mod dominant, în ventriculul drept, în zonele perivasculare şi sub *endocardium*. Contactul mai strîns între grefă şi gazdă se realizează prin aceste zone, ceea ce justifică răspunsul iniţial selectiv al miocardului. Posibilitatea ca trombi intramiocardici să iniţieze infiltratul subendocardic nu poate fi exclusă, dar importanţa ei rămîne foarte limitată. Apariţia precoce (după 3 zile de la operaţie) a unor modificări histopatologice ale miocardului transplantat, care pot fi corelate cu răspunsul imunologic specific al receptorului, este în contrast cu apariţia tardivă (după 6—7 zile de la operaţie) a aceloraşi semne în cursul eliminării primare a altor ţesuturi, cum ar fi pielea (32, 34, 161, 170). Atît întîrzierea apariţiei modificărilor histopatologice, cît şi aceea a sensibilizării faţă de homografă în cazul pielii par a fi determinate de intervalul de 2—4 zile necesar pentru revascularizarea grefei (34, 170).

Scanned with OKEN Scanner

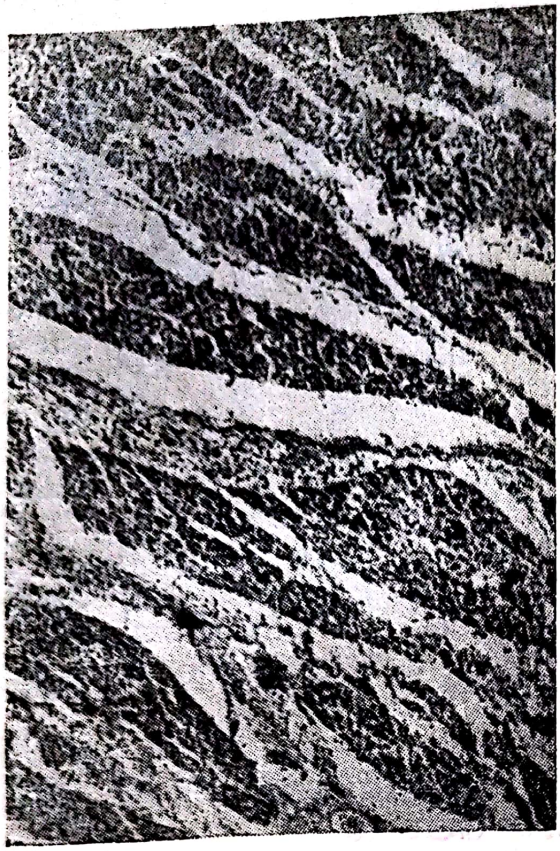


Fig. 58. — Secţiune microscopică a atriului receptorului unui homotransplant cardio-pulmonar uman.

Apar necroze în focar minime şi infiltraţie neutrofilă, mai curînd ca efect al infarctizării decît al procesului imunologic de eliminare (hematoxilină-eozină ; × 30) [după Magovern şi Yates (98)].

Scăderea infiltraţiei cu celule mononucleare între a 6-a şi a 8-a zi în homografele cardiace primare se însoţeşte de distrugeri masive tisulare (1).

Homografele cardiace oferă posibilităţi mari pentru studiul comportamentului vaselor după transplantare (42). Edemul endotelial, modificarea vasculară precoce, se produc concomitent cu edemul interstiţial generalizat şi, prin urmare, este greu de spus dacă el reprezintă efectul primar al reacţiei imune sau dacă este consecinţa edemului miocardic generalizat. Totuşi, observaţiile unor numeroşi autori (89, 161, 162, 165, 166, 172) sugerează că un agent umoral activ, eliberat precoce în cursul eliminării, care vine, deci, în contact imediat cu celulele endoteliului vascular, este foarte operativ în procesul de eliminare.

Deşi hemoragia interstiţială este elementul predominant al finalului histopatologic al eliminării miocardului, nu s-a semnalat la şobolan nici necroza fibrinoidă, nici rupturile pereţilor vaselor miocardice (1).

3. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI PULMONAR

Homografele pulmonare canine experimentale au constituit, aşa cum s-a arătat şi în alt capitol, preocuparea a numeroşi cercetători, care au folosit atît receptori cu reactivitate nemodificată (14, 20—22, 41, 56, 79), cît şi receptori ţinuţi sub tratament imunosupresor (13, 74, 119). În acest din urmă caz supravieţuirea plămînului transplantat a fost prelungită, dar eliminarea s-a manifestat în mod inevitabil prin acelaşi tablou morfologic. În numeroase studii (13, 14, 20—22, 74, 119, 120) au fost incluse scurte descrieri ale unora dintre aspectele morfologice ale eliminării ţesutului pulmonar.

Blumenstock şi colab. (21) au descris pe larg aspectele caracteristice procesului de eliminare, comune şi celorlalte organe, la cîini cu homotransplant pulmonar, netrataţi în vederea suprimării răspunsului imun. Infiltraţia limfocitară perivasculară şi subpleurală şi necroza tisulară sînt elementele cele mai pregnante ale eliminării pulmonare (fig. 59). De asemenea au putut fi puse în evidenţă îngroşări ale pereţilor vaselor mici (fig. 60) şi tromboze multiple ale acestor vase (fig. 61). Aceste leziuni au caracter progresiv şi se extind cu timpul şi la venele mari pulmonare. Tromboza vasculară, mai ales venoasă, a fost sem-

Scanned with OKEN Scanner

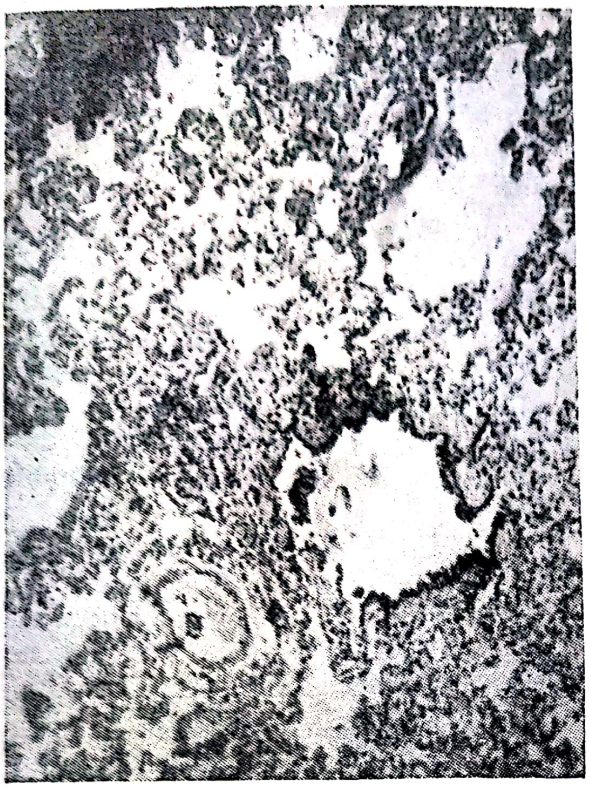


Fig. 59

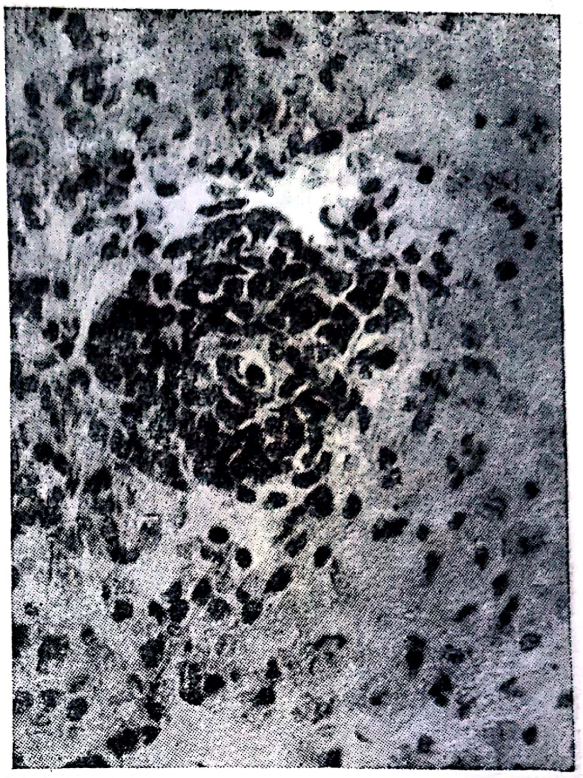


Fig. 60

Fig. 59. — Aspect histologic al plămînului homotransplantat la cîine.

A se nota infiltrația celulară perivasculară și necroza tisulară incipientă (hematoxilină-eozină; × 48) [după Blumenstock și colab. (21)]

Fig. 60. — Secțiune microscopică a lobului inferior stîng după 21 de zile de la homotransplantare.

Se observă puternice infiltrate celulare perivasculare (× 80) [după Nettleblad și colab. (121)].

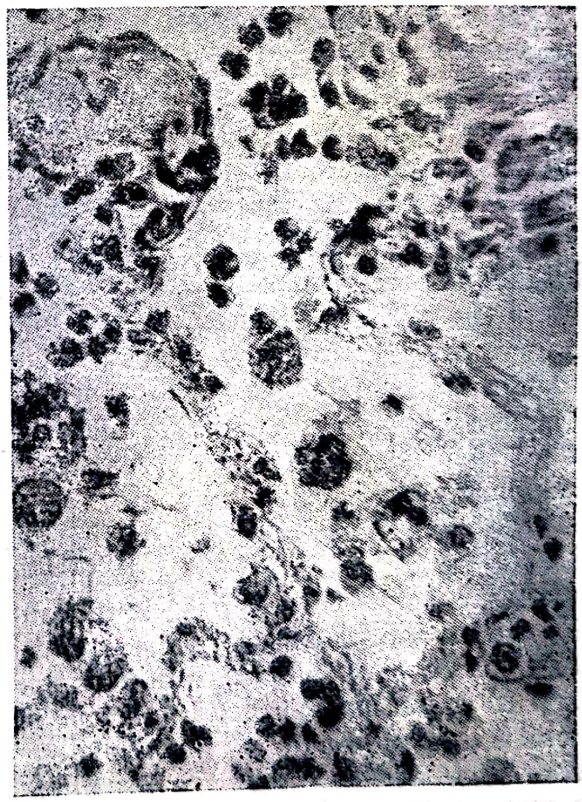


Fig. 61

Fig. 61. — Secțiune microscopică obținută la 8 zile după homotransplantarea plămînului la un receptor netratat.

Se observă trombi multipli în vasele mici (× 80) [după Nettleblad și colab. (121)].

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 62. — Secţiune microscopică a unui homotransplant pulmonar canin după 38 de zile de la transplantare.

Alveolele sînt permeabile, iar infiltraţia perivasculară este minimă şi dispusă zonal (partea de sus a cîmpului microscopic) [după Nettleblad şi colab. (121)].

nalată şi în cazurile de reimplantare a plămînului (121), ceea ce înseamnă că ea este provocată, cel puţin în parte, de actul chirurgical. Ea condiţionează îngroşarea pereţilor alveolari, congestia vasculară perialveolară, prezenţa exsudatului alveolar şi fibroza peribronşică, care apar după autotransplantarea şi homotransplantarea plămînului, leziuni reversibile (în 2—3 luni) în primul caz şi progresive în cel de al doilea caz. Atunci cînd procesul trombotic are o amploare mare în homotransplantele pulmonare, poate masca infiltraţia celulară caracteristică procesului de eliminare, ceea ce a făcut pe cei mai mulţi autori să considere că aspectul de necroză hemoragică este caracteristic pentru eliminarea ţesutului pulmonar homotransplantat.

Leziunile pulmonare de eliminare nu cuprind totalitatea organului transplantat, dacă se foloseşte medicaţia imunosupresoare; ele alternează cu zone de ţesut normal, chiar după 3—5 săptămîni de la transplantare (fig. 62). Modificările histologice de eliminare a homotransplantului pulmonar prezintă diferenţe marcate între stadiile precoce şi stadiile tardive ale procesului, cele dintîi fiind totdeauna mai intense (121).

La om, eliminarea homografei pulmonare este subliniată de modificări histologice similare: exsudat alveolar şi pleural, zone de infarctizare, microtromboze vasculare, leziuni intense, necrotice, în focare sau confluente, ale bronhiilor şi parenchimului şi infiltraţie cu celule mononucleare. Exsudatul alveolar conţine numeroase celule polimorfonucleare şi celule endoteliale degenerate. Celulele endoteliale nedetaşate ale alveolei sînt turgescente, la fel ca şi celulele endoteliale ale vaselor perialveolare. Vasele pulmonare sînt puternic infiltrate cu celule mononucleare, mai ales în medie şi spaţiul subendotelial (98).

În general, primele modificări morfologice ale eliminării pulmonare apar înainte de a 3-a zi de la transplantare. Aşa cum s-a menţionat, între diversele stadii ale eliminării există diferenţe importante. Astfel, după Flax şi Barnes (60), eliminarea începe cu acumularea de celule mononucleare, în primul rînd limfocite şi monocite, în jurul venulelor grefei şi în jurul unor bronhii; arterele sînt evitate în această perioadă. Uneori, după 5 zile de la transplantare, infiltratul celular este mult mai pleomorfic şi se localizează strict în spaţiile perivenoase, care apar dilatate şi foarte evidente (probabil spaţii limfatice). Unele dintre aceste celule par a fi forme mari, imature, blastice, caracterizate printr-un

Scanned with OKEN Scanner

raport nucleu/citoplasmă crescut, cromatină abundentă şi nucleoli voluminoşi. Aceste celule pot fi socotite ca precursoare ale celulelor plasmocitoide, care se găsesc în aceste regiuni într-un stadiu mai înaintat de eliminare. O oarecare tendinţă a celulelor mononucleare din sînge de a se margina de-a lungul endoteliului vaselor afectate se vădeşte în acest stadiu, ca expresie a încetinirii circulaţiei. După 4 zile de la transplantare, afectarea selectivă a venelor de către infiltratul mononuclear dens, asociată cu congestia vasculară şi edemul intraalveolar rămîn semnele caracteristice, arterele continuînd să fie evitate de procesul infiltrativ.

Modificarea morfologică semnificativă următoare este extinderea infiltratului de celule mononucleare, care după 6 zile de la transplantare apare în jurul venelor mari, bronhiilor şi arterelor şi în spaţiile alveolare. Examinarea unora dintre aceste vene mari pune în evidenţă un tip deosebit de „flebită", în care celulele mononucleare aflate în peretele vascular distrug arhitectura normală a acestuia. Celulele care infiltrează pereţii venelor sînt, aproape exclusiv, celule limfoide şi numai în mod excepţional se pot întîlni plasmocite şi forme imature, cu nuclei mari şi nucleoli evidenţi. În acest stadiu sînt prezente în reacţia perivasculară şi în spaţiile alveolare celule histiocitoide mari cu citoplasma palidă şi nuclei veziculari, macrofage şi leucocite polimorfonucleare. Ca o consecinţă a afectării venoase se produc congestia alveolară şi edemul alveolar. Uneori, în pereţii venelor se află material fibrinoid, dar niciodată nu s-au putut găsi semne de necroză fibrinoidă a acestor vase. Infiltratul celular se extinde la ramurile vasculare mici, artere şi vene, dar în cazul arterelor nu trece de faza infiltratului perivascular.

Următoarea modificare semnificativă constă în generalizarea leziunilor vasculare la toate tipurile de vase şi în agravarea leziunilor de necroză hemoragică. În aceste leziuni avansate, care apar la aproximativ 9 zile de la transplantare, şi în care majoritatea structurilor vasculare sînt distruse aproape complet, tromboza se întîlneşte foarte rar, deşi acumulările de celule limfoide şi monocitare de sub stratul endotelial sînt foarte mari. În acest stadiu, membrana elastică internă apare relativ rezistentă la atacul celulelor infiltrante. Totuşi, în unele vase, în special acelea de calibru mic, ea cedează şi, ca urmare, lumenul vascular se obstruează cu „trombi" celulari, în constituţia cărora fibrina sau hematiile se întîlnesc deseori. Deşi cercetările efectuate pe baza perfuziei vasculare nu au dus la rezultate concludente, în privinţa consecinţelor combinaţiei de leziune arterială şi venoasă care caracterizează morfologic procesul de eliminare a plămînului transplantat, se consideră că acestea sînt ocluzia vasculară parţială sau totală şi necroza hemoragică. Acest stadiu se realizează după aproximativ 12 zile de la transplantare.

Sub tratament cu substanţe imunosupresoare se constituie modificări morfologice de eliminare „cronică", în care predomină, spre deosebire de acelea din eliminarea normală, leziunile arteriale (13, 60). De obicei se întîlnesc infiltrate mononucleare în intima arterelor mari (fig. 63 *A*). Celulele acestor infiltrate prezintă un pleomorfism mai important decît infiltratele celulare din ţesutul pulmonar în curs de eliminare la animalele cu reactivitate nemodificată. Aceste celule includ plasmocite, celule mezenchimale nediferenţiate, limfocite şi histiocite. Matricea de colagen a vaselor din zonele în eliminare este laxă, acest fapt fiind socotit fie ca expresia unei tendinţe de „vindecare", fie ca expresia unui

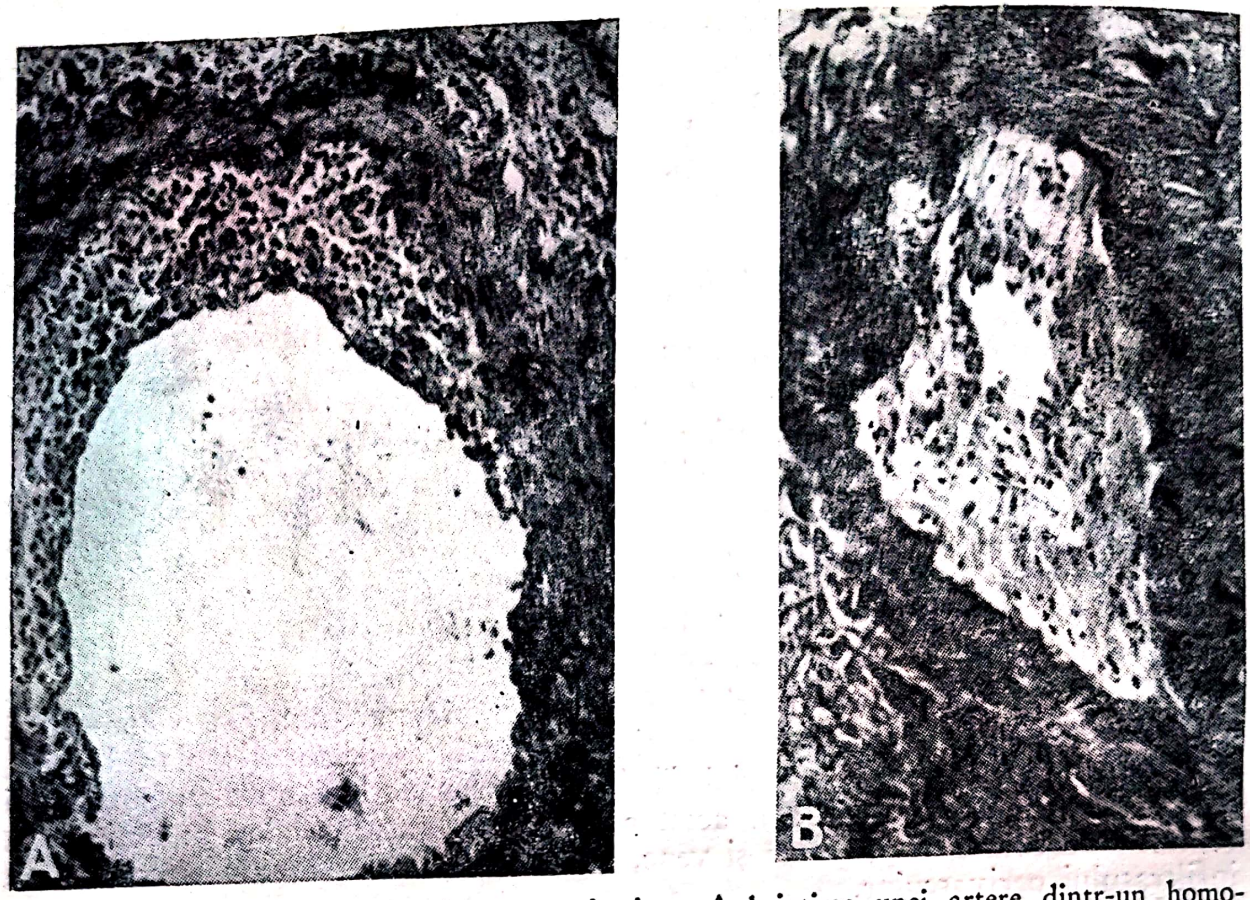


Fig. 63. — *A*-Infiltrat mononuclear extensiv interesînd intima unei artere dintr-un homotransplant pulmonar după 162 de zile de tratament imunosupresor.

Este foarte evident caracterul pleomorfic al infiltratului; *B* — un stadiu mai tardiv al aceluiaşi homotransplant pulmonar. Intima este îngroşată din cauza abundenţei ţesutului fibros şi are puţine celule mononucleare reziduale. Lumenul vasului este micşorat mult (× 190) [după Flax şi Barnes (60)].

stadiu „cronic" al procesului de eliminare (fig. 63 *B*). Uneori, reacţia morfologică a intimei este aproape granulomatoasă, cu numeroase elemente histiocitare. Alteori sînt mai evidente modificările proliferative ale intimei, care, atunci cînd au loc în vasele mici, sînt urmate de reducerea sau chiar obliterarea lumenului vascular. Excepţional se întîlnesc la animalele cu homotransplant pulmonar, ţinute sub tratament imunosupresor, depozite fibrinoide în jurul vaselor sanguine afectate ale grefei şi necroză fibrinoidă (fig. 64 *A*). În sfîrşit, tratamentul imunosupresor deseori nu poate înlătura modificările infiltrative venoase, congestia, necroza hemoragică şi edemul alveolar (fig. 64 *B*), caracteristice procesului normal de eliminare a homografelor pulmonare.

Necroza hemoragică, infarctizarea din stadiile terminale ale eliminării homotransplantelor pulmonare, par să fie consecinţa leziunilor vasculare precoce. Atît din datele experimentale, cît şi din cele clinice reiese că infarctizarea pulmonară nu urmează obstrucţiei arteriale pulmonare (153, 154), iar dacă infarctizarea nu se produce înseamnă că s-a dezvoltat circulaţia colaterală arterială bronhopulmonară (154). Aşadar, lipsa unei circulaţii arteriale bronşice normale în homografele pulmonare poate face aceste grefe mai susceptibile la infarctizare, după instituirea leziunilor vasculare de eliminare. În această privinţă este de asemenea semnificativă observaţia lui Flax şi Barnes (60) potrivit căreia ocluzia

Scanned with OKEN Scanner

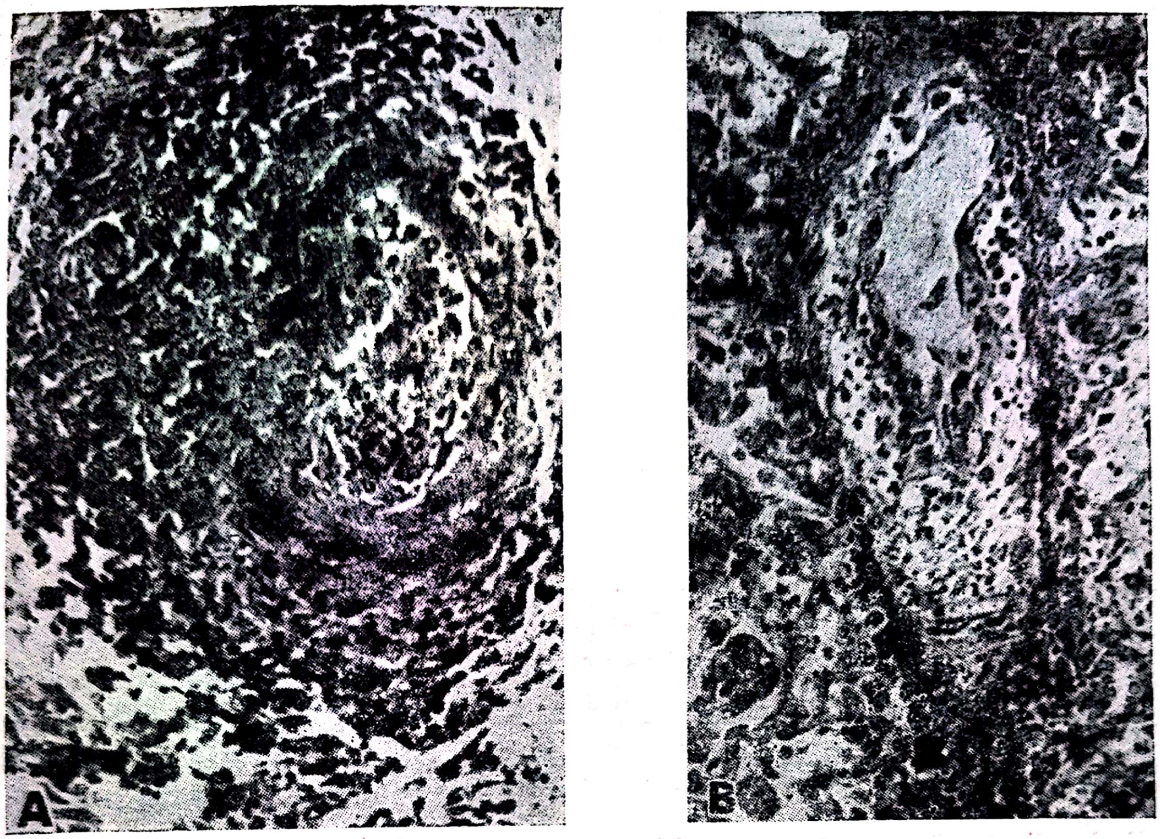


Fig. 64. — *A*-Arterită activă într-un homotransplant pulmonar după 90 de zile de tratament imunosupresor.

Se observă necroza fibrinoidă a peretelui arterial şi modificări inflamatoare cronice, care au dus la obstrucţia lumenului arterei; *B* — modificări venoase „cronice" într-un homotransplant pulmonar după 22 de zile de tratament imunosupresor. Peretele arterial este înlocuit de o stromă laxă de colagen, în care se află celule inflamatoare pleomorfice. Lumenul venos este parţial obstruat. Mase reduse de fibrină se află în spaţiile alveolare (× 230) [după Flax şi Barnes (60)].

venei pulmonare la cîine este mai gravă decît ocluzia arterei pulmonare şi este urmată de hiperemie pulmonară, edem şi hemoragie puternice, adică de aceleaşi modificări pe care le-au descris Blumenstock şi Kahn (22) în cursul eliminării homografelor pulmonare.

4. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI HEPATIC

Procesul de eliminare a ficatului începe cu infiltrarea imunocitelor gazdei în spaţiile periportale şi în jurul venelor hepatice şi, sfîrşeşte prin congestie centrolobulară şi necroză hepatică întinsă (23, 102, 108, 109, 151, 155). Pentru ficat, interpretarea acestor modificări este mai dificilă, dat fiind că acest organ, transplantat, trece printr-o lungă perioadă ischemică postoperatorie. Intensitatea leziunilor ischemice în cazul autotransplantelor hepatice este însă mai puţin importantă decît aceea evidenţiată în homotransplantele hepatice, ceea ce arată că ischemia în această ultimă circumstanţă nu este numai rezultatul intervenţiei chirurgicale şi că, cel puţin în parte, ea este expresia procesului imunologic al

Scanned with OKEN Scanner

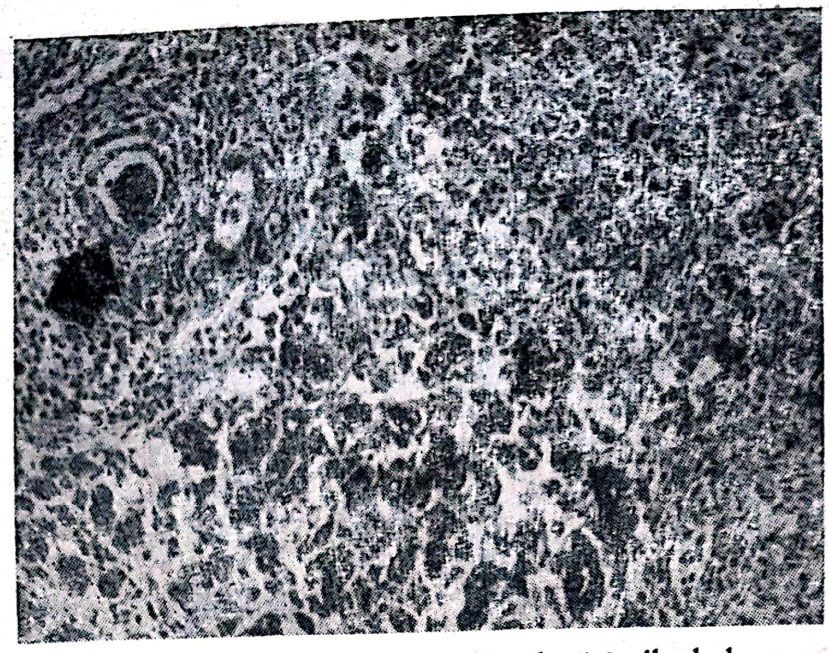


Fig. 65. — Homografă hepatică la cîine după 8 zile de la transplantare.

Zona portală din partea superioară a cîmpului microscopic este infiltrată dens cu celule mononucleare, ramurile portale înşişi fiind acoperite de acest infiltrat celular. Canalele biliare sînt dilatate şi au epiteliu turtit (indicate de săgeată). Există de asemenea o reducere marcată a trabeculelor hepatice cu dezorganizarea lor arhitectonică. În partea de sus-dreapta a cîmpului microscopic apar distrugeri hepatocelulare şi se recunosc numai puţine sinusoide între zonele portală şi centrolobulară [după Moore şi colab. (108)].

eliminării. În figura 65 apar evidente semne de eliminare a unui homotransplant hepatic canin: infiltraţie cu celule mononucleare, reducerea trabeculelor de celule hepatice sau dispariţia lor şi modificarea aspectului sinusoidelor hepatice.

Paronetto şi colab. (123) au stabilit pe modele experimentale, similare acelora descrise de Goodrich şi colab. (66), adică pe homotransplante hepatice auxiliare, că, spre deosebire de homografele de rinichi şi piele, unde ţinta principală a răspunsului imunologic este sistemul vascular (43, 50, 80, 97, 169), în ţesutul hepatic transplantat, distrugerea hepatocitelor precede modificările canalelor biliare şi ale vaselor sanguine şi că modificările incipiente ale acestui ţesut sînt independente de infiltraţia cu celule mezenchimale (histiocite şi plasmocite), care caracterizează eliminarea tuturor ţesuturilor. Se pare totuşi că, la acest model experimental, necroza centrală hepatică este mai curînd consecinţa competiţiei pentru sînge între ficatul autohton şi ficatul auxiliar, mai ales dacă debitul sanguin al venei porte este exclus.

În prezent nu se poate afirma cu certitudine dacă în procesul de eliminare a homografei hepatice, reacţia mezenchimală reflectă o hipersensibilizare de tip întîrziat sau producerea de anticorpi circulanţi împotriva ţesutului transplantat. Apropierea celulelor mezenchimale de hepatocite, înainte de apariţia necrozei sau în timp ce necroza acestor celule se dezvoltă, fapt demonstrat cu ajutorul microscopiei electronice (149), sugerează că are loc un atac direct al celulelor mezenchimale asupra celulelor hepatice. Necroza fragmentară, în focare, din homografele hepatice, se aseamănă cu leziunea care asigură dezvoltarea progresivă a cirozei hepatice umane, independent de etiologie (124).

Scanned with OKEN Scanner

5. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI SPLENIC

După 5—12 zile de la homotransplantarea splinei, ea evoluează fie spre o reducere marcată de volum cu o reacție inflamatoare a țesuturilor din jur (aceasta este eventualitatea mai puțin frecventă și se produce cînd pulsațiile în vasele hilului splenic sînt încă vizibile), fie spre o mărire a volumului, cu o consistență fermă și o cianozare a suprafeței sale (evoluție însoțită de obicei de acumularea de lichid ascitic în cavitatea peritoneală) (84). Capsula splenică rămîne, în general, intactă; fragmentarea capsulei se produce rar, iar ruptura splinei, cu hemoragie intensă mortală este excepțională. Resorbția totală a splinei transplantate la o gazdă netratată se împlinește în 3—4 săptămîni de la transplantare și de cele mai multe ori nu se însoțește de alterarea stării sale generale. Resorbția splinei transplantate are răsunet asupra stării clinice a receptorului numai atunci cînd la acesta se dezvoltă o ascită hemoragică.

Este foarte interesant de semnalat că resorbția splinei transplantate se produce, de regulă, fără un răspuns inflamator semnificativ al țesuturilor din jur. Homotransplantele altor organe, în special cele de rinichi, se însoțesc de un răspuns inflamator deosebit al țesuturilor înconjurătoare. În cazul rinichiului, de exemplu, se dezvoltă adesea un abces delimitat de formațiunile peritoneale ale regiunii în care a fost transplantat acest organ. Absența răspunsului inflamator și absența aderențelor între splină și *omentum* sau alte organe intraabdominale ridică problema mecanismului de resorbție, mai ales în cazurile în care splina scade progresiv în volum, în timp ce capsula sa rămîne intactă. Această circumstanță a sugerat posibilitatea ca absorbția să se producă prin vena splenică, dar o asemenea posibilitate n-a fost încă dovedită (84).

În autotransplantele splenice la cîine, Marchioro și colab. (100) au descris numeroase hemoragii microscopice subcapsulare, o infiltrație moderată cu celule pironinofile a pulpei roșii și o apreciabilă reducere a centrilor germinali din pulpa albă. Infiltrația pironinofilă este prezentă în splinele autotransplantate chiar după 8—10 luni.

La cîini cu homotransplante splenice, netratați cu substanțe imunosupresoare, hemoragiile subcapsulare și infiltrația pulpei albe și a pulpei roșii cu celule pironinofile și leucocite polimorfonucleare sînt deosebit de intense, chiar din primele 2 zile postoperator (38, 58). După 8 zile, hemoragia intraparenchimatoasă masivă și zonele confluente de necroză fac ca țesutul splenic să fie foarte greu de recunoscut. Pulpa albă dispare complet, iar în pulpa roșie, profund alterată structural, se află încă celule pironinofile (100).

Iradierea animalelor cu homotransplant splenic nu împiedică apariția acestor modificări morfologice, ci, dimpotrivă, pare a le exagera, dar tratamentul cu substanțe imunosupresoare le atenuează (100). În cazul unor transplante duble, reno-splenice, la cîine, prezența homotransplantului renal nu exercită nici o influență asupra modificărilor morfologice ale splinei homotransplantate (100).

Scanned with OKEN Scanner

6. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI DE MUŞCHI SCHELETIC

Experienţe de autografiere şi homografiere a muşchiului scheletic, fără asigurarea de la început a irigării sale, au arătat că obstacolul principal în grefarea acestui ţesut, adică sensibilitatea sa foarte mare la lipsa de oxigen, poate fi trecut prin folosirea unor metode care declanşează procese simultane de diferenţiere structurală. Aceste metode au fost prezentate în capitolul I împreună cu rezultatele unor studii morfologice pe care ele le-au înlesnit.

Datele histologice arată că ţesutul muscular striat, secţionat în fragmente foarte mici, poate să-şi refacă structura după autotransplantare şi să-şi recapete funcţia într-un interval de 4—6 luni. De asemenea, ţesutul muscular striat homografiat în aceleaşi condiţii urmează o evoluţie similară, dacă animalele între care se execută operaţia nu fac parte din aceeaşi linie genetică (167). Însă, în acest din urmă caz, aspectul histologic al grefei musculare prezintă şi semne ale reacţiei imunologice: o infiltraţie limfoidă intensă după 21 de zile de la transplantare, care se atenuează mult în următoarele 2—3 luni. Explicaţiile acestui fenomen pot fi multiple: a) imunotoleranţa între membrii aceleaşi linii genetice, dezvoltată în cursul embriogenezei ca urmare a schimburilor proteice dintre mamă şi feţi; b) proteinele aflate în relaţie strînsă sînt din punct de vedere genetic, similare şi sînt capabile de adaptări mutuale. El pare foarte apropiat de fenomenul de „acceptare mutuală" a fragmentelor de piele schimbate la animale între mamă şi puii săi (127).

7. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI DE CORNEE

Invadarea corneei cu vase de neoformaţie, edematierea şi fibrozarea sa sînt modificările histologice cele mai importante care se produc după transplantarea acestui ţesut. Vascularizarea grefelor de cornee a fost prezentată într-o altă secţiune a acestui capitol şi în capitolul I.

Edemul întregii grefe de cornee, cu o creştere moderată a grosimei sale, este prezent totdeauna în cursul primelor 3—5 zile după operaţie, dar după această perioadă el începe să dispară şi treptat corneea devine clară. Dacă edemul grefei de cornee persistă mai mult de 3 săptămîni, transparenţa sa viitoare are de obicei de suferit. Edemul reprezintă condiţia favorizantă a vascularizării grefei de cornee.

Există însă şi o formă de edem moderat al grefei corneene, care se produce imediat după operaţie, nu stimulează vascularizarea sa şi persistă indefinit. Se presupune că această formă de edem ar fi provocată fie de leziuni endoteliale preexistente ale donatorului, fie de lipsa solidarizării straturilor profunde ale grefei cu ţesuturile adiacente ale receptorului. Această formă de edematiere a grefei se întîlneşte şi în unele cazuri de conservare de lungă durată a acesteia la temperaturi scăzute sub protecţia glicerolului, probabil ca urmare a leziunilor endoteliale produse prin conservare.

Tratamentul edemului grefei de cornee (aplicarea locală de glicerol sau diamox cu acţiune asupra anhidrazei carbonice) este practic rareori eficace şi

Scanned with OKEN Scanner

numai temporar, regrefarea fiind de fapt măsura cea mai indicată într-o asemenea împrejurare.

Fibrozarea corneei grefate poate evolua fie pe calea subendotelială a membranei Bowman (membrana anterioară a grefei), fie pe calea membranei Descemet şi a endoteliului său (membrana posterioară a grefei, care se formează după transplantare). Epiteliul cornean la om este rapid înlocuit după lizarea lui, fără opacifiere, dar lezarea membranei Bowman duce adesea la opacifierea corneei. Alături de leziunile traumatice, infecţiile virotice sau bacteriene ale stromei, ca şi invazia cu vase de neoformaţie produc opacifierea grefei de cornee.

Fibrozarea membranei posterioare a grefei de cornee este o formă particulară de neofibroză. Această membrană se constituie în spatele grefei în 3—4 săptămîni după transplantare pe seama ţesuturilor de joncţiune ale receptorului, nu se vascularizează şi pare a avea proprietăţi contractile. Ea se poate prezenta sub trei forme: o membrană fină incompletă, o membrană de grosime medie, care înaintează în cerc spre centrul grefei, sau o membrană densă, care se produce ca urmare a unei hemoragii puternice în camera anterioară a ochiului sau a unei infecţii (145).

Cauzele incriminate în apariţia acestei membrane opacifiante au fost defecte de tehnică de grefare, starea alergică şi traumatismul endoteliului, singura soluţie de corectare a unei asemenea evoluţii a grefei de cornee fiind o nouă grefă.

8. ASPECTELE MORFOLOGICE ALE ELIMINĂRII HOMOTRANSPLANTULUI ARTERIAL

S-a menţionat în repetate rînduri în cursul capitolelor precedente că modificările vasculare ocupă un loc foarte important în evoluţia homografelor de organe la om şi animale (45, 51, 83, 88, 135).

În cazul homografelor arteriale la receptori cu reactivitate nemodificată, reacţia de eliminare evoluează în patru faze: prima fază, care se întinde pe durata primelor 24 de ore, ar putea fi socotită ca faza de „recunoaştere" a homografei de către gazdă şi se caracterizează prin prezenţa celulelor pironinofile aderente de suprafaţa endotelială a vasului. Melrose şi colab. (104) au arătat că aceste celule pot apărea în vasele plămînului transplantat încă din primele 2 ore după operaţie şi nu există nici o îndoială că ele îşi au originea în sîngele circulant al gazdei (47, 61, 132). Aceste celule par a fi precursori plasmocitari, care, cu ajutorul microscopiei obişnuite nu pot fi deosebiţi de limfocitele mici (88, 181); cea de a 2-a fază începe aproximativ după 2 săptămîni de la operaţie şi se manifestă prin creşterea numărului de celule prezente pe suprafaţa intimei vasculare. Todd şi Boctor (175) sînt de părere că această populaţie celulară exagerată rezultă fie din depunerea suplimentară a unor celule din sîngele circulant, fie din proliferarea celulelor existente şi nu din migrarea lor ascendentă sau transparietală, venind din adventicea vasului. Se poate presupune că aceasta este faza reacţională împotriva grefei; ea

trece în mod imperceptibil în faza a 3-a, în cursul căreia celulele reactive din faza a 2-a, care sînt în majoritate plasmocite și macrofage, sînt înlocuite de fibroblaști și celule musculare netede imature. Pe măsură ce stratul pseudointimei vasculare se îngroașă, media se necrozează, din cauza barajului pe care-l creează intima în calea difuziunii substanțelor nutritive spre medie (126). Apariția celulelor musculare netede în pseudointima arterei transplantate sugerează că, sub o stimulare adecvată, celulele care au constituit acest strat pot suferi diferențierea spre celule cu o mai înaltă specializare (168); cea de a 4-a fază a eliminării homografei arteriale este reprezentată de organizarea pseudointimei. În timp ce la 4 săptămîni după transplantare, acest strat are o structură laxă și friabilă, după 12 săptămîni devine dens, bine închegat, care se desprinde ca o formațiune de sine stătătoare de intima adevărată, moartă. Această pseudointimă nu conține, totuși, țesut elastic și prezintă dilatații anevrismale în locurile în care țesutul elastic din media arterei s-a fragmentat.

Din comparația rezultatelor obținute de la animale cu homografe arteriale sub tratament și fără tratament imunosupresor reiese că agenții imunosupresori acționează înaintea fazei reactive. Prima fază a eliminării se desfășoară la fel de rapid în ambele situații, dar faza a 2-a este mult întîrziată la animalele tratate, perioada de întîrziere în acest caz putînd atinge 6 săptămîni.

9. NECROZA FIBRINOIDĂ ÎN ELIMINAREA ORGANELOR ȘI ȚESUTURILOR TRANSPLANTATE

Necroza fibrinoidă constituie aspectul morfologic dominant al tuturor formelor de vasculită neasociate cu eliminarea unei homografe (28, 143, 185). Arterita din boala serului experimentală, cu necroză fibrinoidă și afectarea extensivă a mediei peretelui arterial cu necroză și hialinizare se distinge totuși de arterita descrisă în homografe, la fel cum se deosebește și de periarterita nodoasă la om (185), angeita din stările de hipersensibilizare (185) sau angeita granulomatoasă (28).

Celulele mononucleare au fost implicate ca mediatori ai anumitor tipuri de eliminare a homografelor și nu este exclus ca ele să determine prezența sau absența necrozei fibrinoide într-un anumit țesut în curs de eliminare. De exemplu, eliminarea de tip *first set* a grefei de piele pare a fi inițiată de celulele mononucleare care invadează grefa (17, 180). În homotransplantele renale ale receptorilor netratați cu agenți imunosupresori, eliminarea este mediată de limfocite și plasmocite imature care distrug endoteliul capilarelor peritubulare și produc astfel ischemia peritubulară (87, 134, 181). În homotransplantele pulmonare, atacul mononuclear este de asemenea îndreptat împotriva peretelui venos și a peretelui arterial (13, 14, 21, 60). Celule mononucleare similare sînt implicate în reacțiile de hipersensibilizare întîrziată și într-o varietate de leziuni mediate imunologic ca acelea din boli autoalergice, cum sînt encefalomielita alergică (177, 178) și tiroida alergică (59). Dar mecanismele de producere a leziunilor de eliminare mediate de celulele mononucleare și relația acestor leziuni cu leziunile mediate de anticorpii umorali nu se cunosc încă.

Scanned with OKEN Scanner

C. INFLUENŢA ŢESUTULUI TRANSPLANTAT ASUPRA ALTOR SISTEME ŞI ORGANE

Reacţia locală a organismului faţă de un organ sau ţesut transplantat diferă de la un organ sau ţesut la altul. Asupra acestui fapt s-au prezentat amănunte în cursul acestui capitol. Această secţiune a capitolului se referă numai la reacţia limfatică generală şi regională şi la leziunile care apar în organele şi ţesuturile receptorului unei homografe.

1. REACŢIA LIMFATICĂ GENERALĂ

Homotransplantarea rinichiului se însoţeşte de splenomegalie şi înlocuirea pulpei albe normale a acesteia cu un număr mare de celule cu caracterele plasmocitelor (72, 82). Modificări histologice asemănătoare ale splinei au fost descrise şi după homotransplantarea plămînului la om (108). Ele se însoţesc de semnele unei distrugeri exagerate a hematiilor şi leucocitelor în splină (82), motiv pentru care uneori s-a efectuat ablaţia splinei înainte de transplantarea rinichiului sau a altui organ (82).

Porter şi colab. (136) au întreprins un studiu pe o serie de cîini cu homotransplant renal, care nu au fost trataţi în vederea împiedicării eliminării organului şi au constatat că la 48 de ore după operaţie, numărul limfocitelor mari din jurul venulelor postcapilare ale ganglionilor limfatici şi din ţesutul limfoid periarteriolar din splină creşte considerabil. În categoria limfocitelor mari au fost cuprinse celulele cu nucleul palid, măsurînd 5 microni sau mai mult în diametru, cu nucleii reliefaţi şi o citoplasmă uşor pironinofilă. După 3 zile,

Fig. 66. — Splină prelevată de la un cîine cu homotransplant renal.

Se poate observa hipertrofia foliculilor limfatici [după Parra şi colab. (125)].

alături de limfocitele mari apar în acest organ numeroase alte celule de mărime asemănătoare, dar cu o citoplasmă puternic pironinofilă şi adesea cu un nucleu excentric. Aceste celule se dispun în pulpa roşie. Părţile centrale ale foliculilor limfatici conţin în acest moment limfocite de dimensiuni mari şi mijlocii, iar

Scanned with OKEN Scanner

mitozele reprezintă un fenomen obișnuit. Puține zile după aceea, în splină apar plasmocite, care se dispun de asemenea în rețeaua pulpei roșii, ceea ce face ca foliculii să apară ușor măriți. Constatări similare au făcut Parra și colab. (125), care au semnalat o infiltrație histiocitară intensă a splinei după homotransplantarea rinichiului sub tratament imunosupresor complex (iradiație, substanțe antimitotice, suspensie limfocitară) (fig. 66), și Rechtchikov și Matsukura (141), care au constatat că celulele hiperbazofile neplasmocitare, bogate în ribozomi și lipsite de ergastoplasmă, care infiltrează ganglionii limfatici afectați zonei de plasare a unui homotransplant (18, 19), pot apărea și în sîngele periferic al gazdei, alături de plasmocite. Variațiile numărului acestor celule în sîngele periferic sînt paralele cu evoluția proceselor imunologice: în cazul primei grefe, celulele hiperbazofile neoplasmocitare apar în sîngele periferic înaintea plasmocitelor, iar în cazul celei de a doua grefe apar într-un număr la fel de mare, dar persistența lor este de mai scurtă durată, procesul de eliminare fiind mai rapid în acest ultim caz (tabelul 27).

Tabelul 27

Procentul celulelor hiperbazofile neplasmocitare și al plasmocitelor în sîngele periferic al iepurilor cu homografe de piele *

Control		Procentul celulelor plasmocitare	Procentul altor celule hiperbazofile
Prima grefă	3 zile	1,02	4,97
	6 zile	0,98	2,03
	9 zile	0,98	4,96
	12 zile	2,00	2,00
	15 zile	1,03	1,03
A doua grefă	3 zile	0	3,97
	6 zile	3,97	3,01
	9 zile	0	2,03
	12 zile	0	0
	15 zile	1,00	0

* Lotul de control de 10 iepuri; celelalte două loturi de cîte 5 iepuri. $P < 0,05$ [după Rechtchikov și Matsukura (141)].

Toți ganglionii limfatici prezintă oarecare îngroșare a corticalei, începînd cu a 3-a zi de la operația de transplantare, dar acest fenomen este mai evident numai în ganglionii limfatici mezenterici și lombari, în cazul transplanturilor pelviene și numai în ganglionii cervicali, cînd transplantul a fost plasat în această regiune. În corticala ganglionară hipertrofiată apar celule limfoide, mari, centrele germinale încep să se împuțineze în medulară, iar trabeculele medulare se măresc, datorită unor limfocite mari și medii și a plasmocitelor în această zonă (fig. 67 *A, B*).

Potrivit părerii lui Porter și colab. (136), după homotransplantarea rinichiului, sistemul limfatic al gazdei suferă modificări comparabile cu acelea observate de Gallone și colab. (63), André și colab. (7), Scothorne și McGregor (150) și Burwell (24) în ganglionii limfatici regionali după transplantarea pielii.

Se pare că celulele din infiltratele țesuturilor transplantate își au originea în țesutul limfoid al gazdei. Administrîndu-se timidină marcată cu tritium în artera splenică a unui cîine, în primele 5 zile consecutive homotransplantării

Scanned with OKEN Scanner

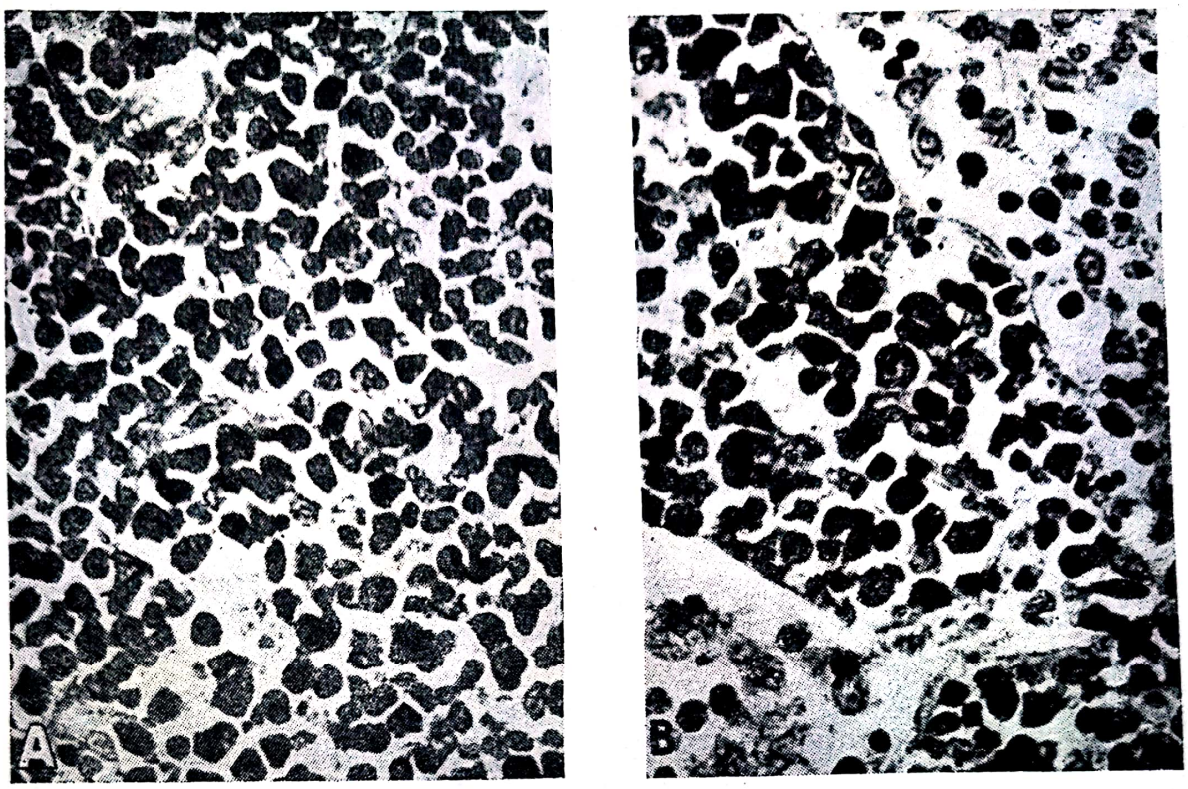


Fig. 67. —
A — corticala unui ganglion limfatic mezenteric de la un cîine la 7 zile după homotransplantarea rinichiului. Cele mai multe celule sînt plasmocite cu citoplasmă intens pironinofilă (apare în culoare neagră în fotografie); *B* — medulara unui ganglion limfatic mezenteric de la un cîine la 7 zile după homotransplantarea rinichiului. Formațiunea trabeculară a medularei apare îngroșată și încărcată cu plasmocite și limfocite mari și mijlocii (verde de metil-pironină; × 900) [după Porter și colab. (136)].

unui rinichi, s-a contatat că aproape 10% din celulele care infiltrează acest rinichi se marchează cu tritium. Aceeași substanță radioactivă, administrată animalului cu 24 de ore înainte de operația de transplantare a rinichiului, nu se mai poate detecta în celulele care infiltrează homotransplantul după 24, 72 sau 96 de ore (136). Înlocuindu-se timidina marcată cu adenozina marcată s-a constatat că începînd din a 4-a zi, după homotransplantarea unui rinichi, acesta este invadat de asemenea și de celule din canalul limfatic toracic (136).

2. REACȚIA LIMFATICĂ REGIONALĂ

Gallone și colab. [citați de (146)] au descris pentru prima dată unele modificări particulare morfologice și citologice care apar în ganglionii limfatici regionali drenanți ai unui țesut homografat. Observațiile lor au fost confirmate mai tîrziu de alți autori (54, 150, 183, 184). De altfel, înaintea acestor autori, Ehrich și Harris (55) au semnalat creșterea numărului de celule din limfa ganglionilor limfatici regionali după introducerea locală a unui antigen bacterian sau proteic; ei au constatat că în același timp apar în limfă anticorpi specifici în titru ridicat. Ulterior, observații similare au fost publicate și de Hall și Bede (70).

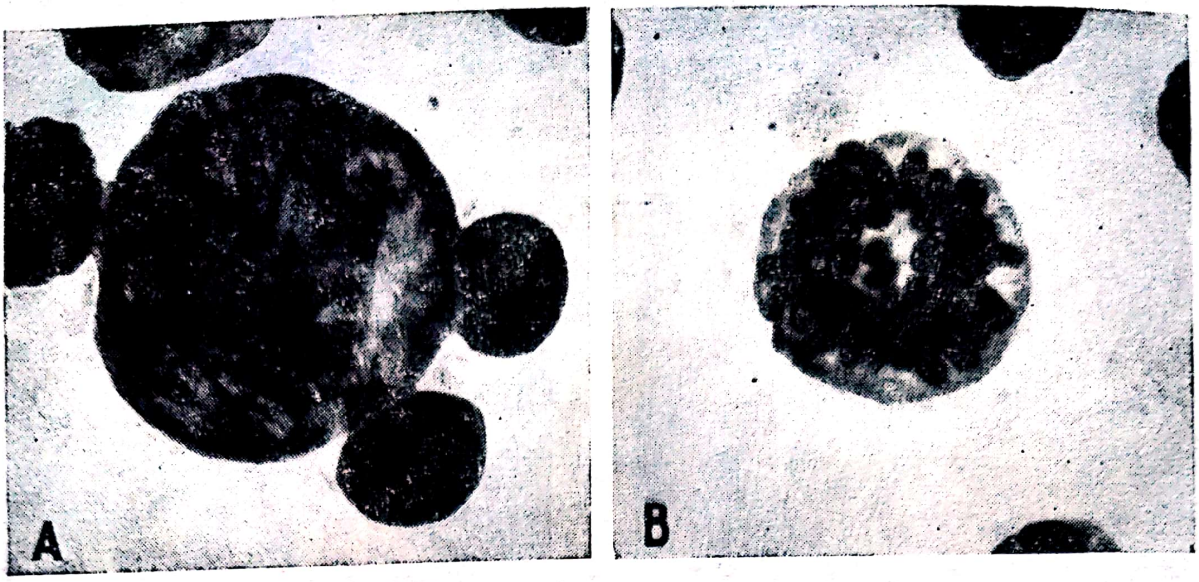


Fig. 68. —

A — celulă blastică din limfa unui ganglion limfatic care drenează o heterografă de piele. Celula este mare, nucleul are o structură fină, iar citoplasma prezintă o zonă largă bazofilă; *B* — o astfel de celulă în mitoză (May-Grünwald-Giemsa; × 100.) [după Rymaszewska şi colab. (146)].

În mod normal, limfa ganglionilor limfatici mijlocii, cum ar fi ganglionii limfatici popliteali, conţine aproximativ 10 000 celule/mm^3, iar dintre acestea numai 0,84% sînt celule blastice (146). Numărul acestora creşte însă de peste 9 ori, iar formele blastice ajung la o proporţie de 3—4 ori mai mare, după aplicarea unei heterografe de piele în regiunea pe care o drenează aceşti ganglioni (fig. 68 *A, B*). În general, aceste celule sînt constituite din plasmocite şi celule pironinofile, care îmbină unele caractere ale limfocitelor cu unele caractere ale plasmocitelor şi pot fi încadrate în tipul II de limfocite, descrise de Holub şi Riha (77). Aceste celule au fost descrise şi de alţi autori (147, 186), dar pînă în prezent nu s-a stabilit originea lor. Celulele blastice din limfă şi ganglionii limfatici reprezintă celule competente imunologic. Nu se ştie ce evoluţie au aceste celule în organism. Este posibil ca unele dintre ele să fie oprite în ganglionii limfatici succesivi prin care trece limfa; altele pot ajunge în sîngele circulant prin canalul toracic şi de aici în splină sau alte părţi ale sistemului limfatic. Pe această cale, întregul sistem limfatic ar putea fi invadat de celule competente imunologic, avînd originea în ganglionii limfatici regionali (25, 146). Aceste celule ar putea servi ca material celular pentru eliminarea de tip *second set* (7, 129).

O foarte puternică infiltraţie cu plasmocite a ganglionilor limfatici traheobronşici a fost descrisă după homotransplantarea plămînului (98).

Absenţa modificării proteinelor totale şi a fracţiunilor proteice electroforetice nu poate exclude formarea anticorpilor umorali specifici (115, 166). Este posibil ca după o singură stimulare, cantitatea de anticorpi să nu fie detectabilă prin metodele actuale. Pînă acum s-a încercat deseori stimularea producţiei de anticorpi prin numeroase grefe succesive şi s-au căutat metode de citotoxicitate a limfei pentru a se putea detecta anticorpii umorali din limfa drenată după aplicarea unor homo- sau heterografe (94, 174, 179). Rezultatele acestor încercări nu sînt însă satisfăcătoare.

Leziuni vasculare. Shiel şi colab. [citaţi de (68)] au evidenţiat necroze întinse în pereţii arteriali ai unui cîine care a eliminat homografe renale multiple. Pereţii arteriolari îngroşaţi sînt infiltraţi cu celule mononucleare (39). Necroza fibrinoidă a pereţilor arteriali şi arteriolari este pronunţată chiar după tratament cu substanţe imunosupresoare. Uneori, ea cuprinde toată grosimea şi circumferinţa peretelui vascular, alteori ea are o evoluţie zonală, limitîndu-se fie la medie, fie numai la o anumită parte din circumferinţa vasului.

Leziuni hepatice. Parra şi colab. (125) au descris producerea unei congestii hepatice fără vreo altă modificare semnificativă la cîini cu homotransplant renal, ţinuţi sub tratament imunosupresor complex (fig. 69). Hamburger şi colab. (72) citează de asemenea cazuri de ciroză hepatică după homotransplantarea rinichiului. Uneori s-a semnalat hiperplazia celulelor Kupffer la bolnavii cu homotransplant renal (70), fără să existe vreo modificare a testelor de investigaţie funcţională hepatică.

Leziunile măduvei osoase. La animale cu rinichi homotransplantat sub tratament imunosupresor a fost descrisă hipoplazia măduvei osoase, putînd să ajungă pînă la zone întinse de aspect aplastic, în care celulele medulare au fost înlocuite de adipocite (fig. 70). În măduva osoasă recuperată de la asemenea animale şi reimplantată se observă că populaţia normală de elemente limfoide şi mieloide este înlocuită de plasmocite (fig. 71), fără ca aceste schimbări în structura celulară să se repercuteze asupra conţinutului proteic al ţesutului. Pe o secţiune vertebrală a măduvei osoase, la un bolnav cu homotransplant pulmonar, Magovern şi Yates (98) au observat că raportul celule adipoase/celule medulare a crescut la aproximativ 10/1, populaţia celulară neadipoasă avînd citoplasma fin vacuolată şi cuprinzînd celule reticulare, blastocite şi alte forme celulare imature, megacariocite, puţine plasmocite, foarte puţine focare limfocitare şi nici o formă celulară matură.

Leziuni pulmonare. Rifkind şi colab. (144) au descris pneumonii manifeste clinic după transplantarea rinichiului. În puţinele cazuri în care aceste pneumonii au fost fatale s-a izolat *Pneumocystis carinii*. Starzl şi colab. (159) au prezentat cazuri de infecţii pulmonare diseminate, produse de variaţi germeni endogeni, şi de *B. tuberculosis*, precum şi cazuri de candidoză pulmonară la bolnavii cu homotransplant renal care au primit doze mari de substanţe imunosupresoare.

La bolnavii cu homotransplant pulmonar Magovern şi Yates (98) au descris în plămînul autohton distensiunea şi deformarea alveolelor, ai căror pereţi apar îngroşaţi, fibrotici şi, relativ, avasculari. Zonele peribronşice pot prezenta infiltraţie celulară polimorfonucleară şi leziuni exsudative, de tip pneumonie. Arteriolele pulmonare sînt de asemenea afectate, hipertrofia mediei vasculare fiind modificare pregnantă. Aceste aspecte histologice sînt specifice infecţiei pulmonare şi nu par a avea legătură cu eliminarea plămînului transplantat.

Leziuni miocardice. Moore şi colab. (108) au găsit frecvent leziuni miocardice după efectuarea homotransplantelor hepatice la cîine, constînd din zone de necroză şi calcificare. Aceste leziuni par a fi condiţionate de hipotensiunea postoperatorie severă şi nu par a avea legătură cu eliminarea parenchimului hepatic, dat fiind că sînt similare acelora provocate de stările prelungite de

Scanned with OKEN Scanner

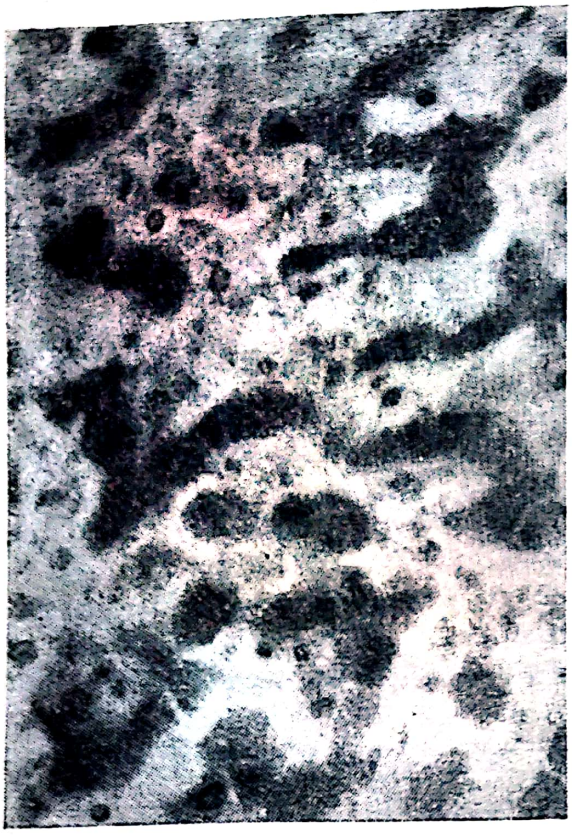


Fig. 69

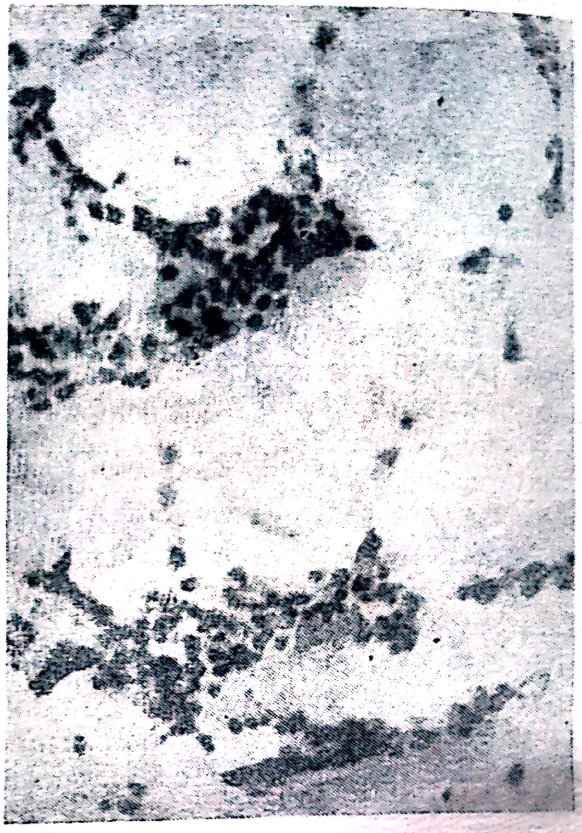


Fig. 70

Fig. 69. — Ficat prelevat de la un cîine cu homotransplant renal.
Congestie, fără vreo altă modificare semnificativă [după Parra şi colab. (125)].

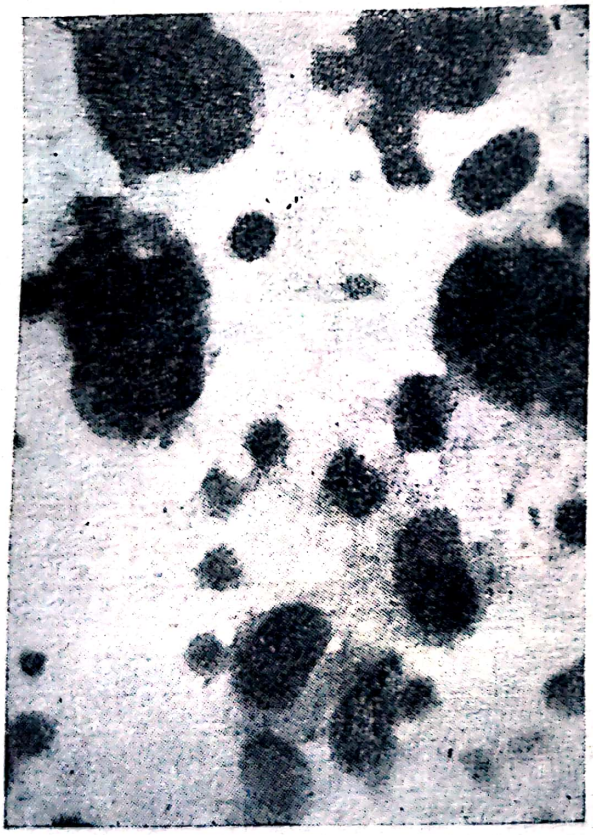


Fig. 70. — Măduvă osoasă hipoplastică la un cîine cu transplant renal [după Parra şi colab. (125)].

Fig. 71. — Măduva osoasă recuperată de la un cîine cu transplant renal iradiat arată înlocuirea populaţiei celulare obişnuite cu plasmocite şi histiocite după ce a fost reimplantată [după Parra şi colab. (125)].

Scanned with OKEN Scanner

soc. Magovern și Yates (98) au semnalat de asemenea leziuni necrotice în focare și infiltrație neutrofilă în miocardul uman după homotransplantarea plămînului, dar le-au interpretat ca leziuni de infarctizare.

Leziuni pancreatice. Pancreatita este o complicație obișnuită a homotransplantului hepatic ortotopic (108).

BIBLIOGRAFIE

1. Abbott C. P., Dewitt C. W., Creech O. — *Transplantation*, 1965, *3*, 432.
2. Algire C. H., Legallais F. Y. *J. nat. Cancer Inst.*, 1949, *10*, 225.
3. Allen A. C. — *Amer. J. Med.*, 1955, *18*, 277.
4. Altman B. — *Ann. roy. Coll. Surg. Engl.*, 1963, *33*, 79.
5. Altman B., Simonsen M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 28.
6. Amos D. B. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *87*, 273.
7. André J. A., Schwartz R. S., Mitus W. J. , Dameshek W. — *Blood*, 1962, *19*, 313.
8. Ashton N. — The Transparency of the Cornea (S. Duke-Elder, E. S. Perkins), Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960, p. 131.
9. Ashton N., Cook C. — *Brit. J. Ophtal.*, 1953, *37*, 193.
10. Ballantyne D. L., Converse J. M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *64*, 958.
11. Ballantyne D. L., Platt J. M., Converse J. M. — *Surg. Forum*, 1963, *14*, 472.
12. Ballantyne D. L., Platt J. M., Converse J. M. — *Transplantation*, 1965, *3*, 1.
13. Barnes B. A., Flax M. H. — *Transplantation*, 1964, *2*, 343.
14. Barnes B. A., Flax M. H., Burke J. F., Barr G. — *Transplantation*, 1963, *1*, 351.
15. Bauer J. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 663.
16. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Proc. roy., Soc. B.*, 1959, *143*, 43.
17. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1959, *143*, 58.
18. Binet J. L., Mathé G. — *C. R. Acad. Sci., (Paris)*, 1961, *253*, 1 852.
19. Binet J. L., Mathé G., Seman G., Kinsky L., Amiel J. L. — *Nouv. Rev. franç. Hémat.*, 1961, *1*, 887.
20. Blumenstock D A., Collins J. A., Hectman B., Donnall E. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 882.
21. Blumenstock D. A., Collins J. A., Hectman H. B., Hosbein D. J., Lempert N., Thomas E. D., Ferrebee J. W. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 677.
22. Blumenstock D. A., Kahn D. R. — *J. Surg. Res.*, 1961, *1*, 40.
23. Brock D. R., Starzl T. E. — *Exp. Molec. Path.*, 1962, *1*, 197.
24. Burwell R. G. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, (3), 821.
25. Burwell R. G., Gowland G. — *J. Bone Jt. Surg.*, 1961, *43 B*, 820.
26. Cascarano J., Zweifach B. W. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1959, *5*, 309.
27. Celada F., Welshons W. J. — *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1962, *48*, 326.
28. Churg J., Strauss L. — *Amer. J. Path.*, 1951, *27*, 277.
29. Chutna J., Pokorna Z. — *Folia Biol. (Praha)*, 1961, *7*, 32.
30. Converse J. M., Ballantyne D. L. — *Plast. reconstr. Surg.*, 1962, *30*, 415.
31. Converse J. M., Ballantyne D. L., Rogers B. O., Raisbeck A. P. — *Transplant. Bull.*, 1957, *4*, 154.
32. Converse J. M., Ballantyne D. L., Woisky J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 693.
33. Converse J. M., Filler M., Ballantyne D. L. — *Transplantation*, 1965, *3*, 22.
34. Converse J. M., Rapaport F. T. — *Ann. Surg.*, 1956, *143*, 306.
35. Conway H., Griffith B. H., Shannon J. E., Findley A. — *Plast. reconstr. Surg.*, 1957, *20*, 103.
36. Conway H., Joslin D., Stark R. B. — *Plast. reconstr. Surg.*, 1951, *8*, 194.
37. Cudkowicz G., Cosgrove G. E. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1960, *105*, 366.
38. Dammin G. J., Wheeler H. B., Montague A. C. W., Dealy J. B., Greenberg J. B., Moore F. C. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 861.
39. Darmady E. M., Dempster W. J., Stranack F. — *J. Path. Bact.*, 1955, *70*, 225.
40. Darmady E. M., Offer J. M., Stranack F. — *Brit. med. J.*, 1964, *2*, 976.

Scanned with OKEN Scanner

164. Stetson C. A. — Mechanisms of Hypersensitivity (J. H. Schaffer), Ed. Little-Brown, Boston, 1959.
165. Stetson C. A., Demonpoulos R. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 687.
166. Stetson C. A., Jensen E. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 249.
167. Studitsky A. N. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 789.
168. Stump M. M., O'Neal R. M., Halpert B., DeBakey M. E., Jordan G. L. — *Surg. Forum*, 1963, *14*, 301.
169. Taylor A. C., Lehrfeld J. W. — *Plast. reconstr. Surg.*, 1953, *12*, 423.
170. Taylor A. C., Lehrfeld J. W. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, *59*, 351.
171. Teodorescu-Exarcu I., Păuşescu E., Roman E. — *Probl. Chir. Ortoped. (Buc.)*, 1964, *1*, 93.
172. Terasaki P. L., Akiyama T., McLelland J. D., Cannon J. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 645.
173. Terasaki P. I., Cannon J. A., Longmire W. P. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1959, *102*, 280.
174. Terasaki P., McLelland J. D., Cannon J. A., Longmire W. P. — *J. Immunol.*, 1961, 87, 39.
175. Todd I. A., Boctor Z. N. — *Transplantation*, 1966, *4*, 123.
176. Vickery C. M., McCombs H. L., Warren R. — *New Engl. J. Med.*, 1965, *272*, 325.
177. Waksman B. H. — *Int. Arch. Allergy*, 1959, 14, Suppl. 1, 1.
178. Waksman B. H. — Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity (G.E.E. Wolstenholme, M. O'Connor), Ed. Little-Brown, Boston, 1960, p. 280.
179. White R. G. — Mechanisms of Antibody Formation (M. Holub, J. Jarosková), Ed. Czech. Acad. Sc., Praga, 1962.
180. Wiener J., Spiro D., Russell P. S. — *Amer. J. Path.*, 1964, *44*, 319.
181. Williams P. L., Williams M. A., Kountz S. L., Dempster W. J. — *J. Anat. (Lond.)*, 1964, *98*, 545.
182. Woodruff M. F. A. — The Transplantation of Tissues and Organs, Ed. Thomas, Springfield-Illinois, 1960, p. 29.
183. Zaleski M., Rymaszewska T., Kurnatowski W., Lojek T. — *Folia morph. (Warszawa)*, 1964, *15*, 265.
184. Zaleski M., Rymaszewska T., Lojek T., Kurnatowski W. — *Transplantation*, 1964, *2*, 207.
185. Zeek P. M. — *New Engl. J. Med.*, 1953, 248, 764.
186. Zucker-Franklin D. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1963, 9, 325.
187. Zukoski C. F., Callaway J. M. — *Nature (Lond.)*, 1963, *198*, 706.
188. Zukoski C. F., Ende N. — *Transplantation*, 1965, *3*, 118.
189. Zukoski C. F., Lee H. M., Hume D. H. — *Surgery*, 1961, *50*, 926.

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE BIOCHIMICE ALE TRANSPLANTĂRII ŢESUTURILOR ŞI ORGANELOR

În domeniul investigaţiei proceselor biochimice care dublează reacţiile imunologice de eliminare a ţesuturilor şi organelor transplantate există o penurie de date, care contrastează cu multitudinea datelor rezultate din investigaţiile imunologice şi clinico-morfologice. Tentativele de realizare a unei stări de imunopresiune pe cale chimică au permis stabilirea unor relaţii între sinteza proteinelor şi a acizilor nucleici, pe de o parte, şi realizarea stării de imunotoleranţă, pe de altă parte, dar procesele biochimice implicate în această stare sînt, cu certitudine, mult mai complexe. Insuficienţa cunoştinţelor în acest domeniu explică în mare măsură succesele practice limitate în transplantarea organelor şi ţesuturilor.

Considerăm că această situaţie justifică preocuparea noastră deosebită pentru aspectele biochimice ale transplantării ţesuturilor şi organelor.

A. ACTIVITATEA METABOLICĂ A ŢESUTULUI TRANSPLANTAT

Pînă în prezent s-au făcut cîteva încercări de a se stabili corelaţia dintre eliminarea organelor transplantate de la un organism la altul şi modificările biochimice din aceste organe, în scopul elucidării mecanismului de eliminare.

Cele mai multe asemenea tentative au avut loc la cîini cu homotransplant renal (23, 34, 58, 92, 119, 120, 124, 132, 133), pentru că metodele de investigaţie funcţională şi studiu metabolic disponibile permit o abordare mai uşoară a acestui organ.

1. MODIFICĂRILE CONSUMULUI DE OXIGEN ÎN ŢESUTURILE TRANSPLANTATE

a) **Homotransplantul renal.** Cercetările lui Nathan şi colab. (92) au arătat că numeroase teste de investigaţie funcţională şi metabolică celulară rămîn nemodificate în cursul eliminării homotransplantului renal la cîine. Chiar în cazul unei eliminări accelerate a rinichiului la animale imunizate specific, metabolismul ţesutului renal, măsurat *in vitro*, se menţine între limitele stabilite pe ţesutul renal normal (tabelul 28).

Scanned with OKEN Scanner

Aceeaşi neaşteptată lipsă de modificări metabolico-funcţionale în cursul eliminării homotransplantului renal a fost înregistrată şi cu ajutorul unei metode complexe de investigaţie, sensibilă şi specifică pentru rinichi, implicînd metabolismul oxidativ al ţesutului şi anume, acumularea de PAH în microsecţiuni de corticală renală incubate într-un mediu adecvat. Corticala rinichiului transplantat, aflat în curs de eliminare, acumulează PAH (92). Se ştie că acumularea PAH de către corticala renală este condiţionată de metabolismul oxidativ al ţesutului (41, 81) şi de relaţii ionice de tipul $RCOO^-X^+$, care reclamă intervenţia unor sisteme enzimatice cu acţiune asupra grupărilor carboxilice libere (114) şi, ca atare, lipsa afectării sale poate fi socotită ca expresia unui metabolism oxidativ nealterat. De asemenea, în cursul eliminării homotransplantului renal se menţine între limite normale şi alt parametru important al metabolismului tisular: încorporarea ^{32}P în fracţiunile acido- şi lipidosolubile şi în acizii nucleici din ţesutul transplantat (92).

Tabelul 28

Consumul de oxigen ($\mu l\ O_2/g$ ţesut/min.) al corticalei rinichiului canin transplantat. Rinichiul transplantat a fost prelevat după 24 de ore de la transplantare *

Ţesutul	Numărul de experienţe	Consumul de oxigen	
		Medie	Limite
Rinichi normal	12	266	247—312
Homotransplant renal primar	4	207	164—233
Autotransplant renal	2	225	223—226
Homotransplant renal secundar **	7	205	148—229
Homotransplant renal efectuat după perfuzia încrucişată ***	3	207	130—233

* După Nathan şi colab. (92).

** Primul rinichi transplantat a fost eliminat înaintea transplantării celui de al doilea rinichi de la acelaşi donator.

*** Perfuzia încrucişată între donator şi receptor s-a efectuat cu o săptămînă înaintea transplantării rinichiului.

Este interesant faptul că aceste constatări au fost făcute în momentul în care rinichiul transplantat a prezentat semne evidente de eliminare (anurie, edem, hemoragie şi leziuni capilare), ceea ce înseamnă că ţesutul homotransplantat îşi păstrează capacitatea de a funcţiona *in vitro*, chiar atunci cînd există semne severe de alterare funcţională *in vivo*. Aceste fapte confirmă părerea lui Woodruff (136), care susţine că după o perioadă critică, anumite homografe pot continua să funcţioneze în mod nelimitat. Eliminarea organului ar începe, aşadar, cu reducerea debitului său sanguin şi nu cu producerea unor leziuni biochimice (68, 93, 109); oricare celulă parenchimatoasă a homotransplantului, care scapă invaziei limfoide şi îşi asigură un oarecare aport sanguin, supravieţuieşte o perioadă lungă de timp.

Pe de altă parte, cea mai mare parte a activităţii dehidrogenazei lactice evidenţiată în urină, avîndu-şi sursa în rinichi (110, 127), oricare proces care produce leziuni ale parenchimului renal, deci şi eliminarea sa, poate provoca creşterea activităţii acestei enzime în ţesut şi în urină. Eliminarea rinichiului transplantat este adesea întovărăşită de un nivel ridicat al activităţii dehidrogenazei lactice în urină (60).

b) **Homotransplantul cardiac.** Într-o serie de 27 de modele experimentale de transplantare heterotopică a inimii (inimă de căţel transplantată la gîtul

Scanned with OKEN Scanner

unui cîine adult), Reemtsma (107) a constatat că la un debit sanguin miocardic, relativ constant, valoarea medie fiind 160 ml/100 g țesut/min., consumul de oxigen a fost 7,3 ml O_2/100 g țesut/min., iar consumul de glucoză al inimii transplantate a fost 14,6 ml O_2/100 g țesut/min. Inima transplantată prezintă inițial o balanță negativă de lactat care, ulterior, nu se corectează decît parțial (108).

2. UNELE MODIFICĂRI ALE STRUCTURILOR PROTEICE

Homotransplantele primare de rinichi canin se tumefiază rapid și în aproximativ 5 zile de la transplantare devin de 2—3 ori mai grele decît au fost inițial (32). Această modificare de greutate care se produce într-o măsură mult mai mică la autotransplantele renale se însoțește de creșterea procentului de apă din țesut (132).

a) **γ-Globulinele tisulare.** Începînd cu a 3-a zi de la transplantare, conținutul de γ-globuline al vaselor sanguine ale țesutului renal crește, fenomenul fiind condiționat de reacția imunologică a organismului și formarea complexelor antigen-anticorp în parenchim (20, 58). El se însoțește de o importantă hiper-γ-globulinemie (52). Extrem de rar se pot vedea în media vaselor mici depozite de α_2-globuline și de fibrinogen, asemănătoare acelora de γ-globuline (58). Prezența γ-globulinelor în absența albuminelor și a fibrinogenului în vasele sanguine mici și arteriolele aferente ale homotransplantelor renale în curs de eliminare pledează împotriva posibilității ca γ-globulinele să reprezinte un simplu exsudat sau transsudat în zona parenchimatoasă afectată. Spre deosebire de depozitele parietale vasculare de γ-globuline, depozitele tubulare, care conțin, alături de γ-globuline, albumine, fibrinogen și α_2-globuline, reprezintă un transsudat. De asemenea, faptul că în autografele renale supuse unor perioade lungi de anoxie, sau în autografele renale cu procese pielonefritice severe nu se evidențiază γ-globuline în pereții vaselor mici, cu toată gravitatea reacției inflamatoare, este un argument suplimentar în favoarea specificității prezenței acestor globuline în homografele renale. Așa cum s-a mai menționat, cea mai atractivă ipoteză asupra sursei γ-globulinelor din rinichiul transplantat și asupra rolului lor în eliminare este aceea că γ-globulinele sînt anticorpii gazdei produși împotriva antigenelor grefei. În sprijinul acestei ipoteze pot fi menționate și observațiile lui Gorer (45) privind izoaglutininele circulante din transplantele tumorale, ale lui Pávková și Doležalova (98), privind anticorpii umorali induși de grefele de piele, ale lui Wright și MacPhee (137) privind efectul favorabil al hipo- γ -globulinemiei asupra supraviețuirii grefelor de piele sau acelea ale lui Voisin și Maurer (126) și Najarian și Feldman (90), obținute cu ajutorul serurilor imune sau al unor agenți umorali provenind din limfocite sensibilizate. γ-Globulinele vasculare sub forma depozitelor extracelulare apar înainte de a se putea evidenția numeroase celule conținătoare de γ-globuline în infiltratul perivascular. În infiltratul celular există un mare număr de hemocitoblaști care nu conțin γ-globuline, dar care pot constitui sursa γ-globulinelor din peretele vascular. Totuși, în cursul eliminării de tip *first set*, nu s-au putut evidenția γ-globuline serice legate de vreo structură a rinichiului eliminat (37, 58). De asemenea, nu s-a putut demonstra legarea ^{131}I-γ-globulinelor de structurile unei homografe secundare (43). Producerea locală și utilizarea rapidă locală a

Scanned with OKEN Scanner

unui anticorp umoral poate fi incriminată în explicaţia acestei neconcordanţe. Este plauzibilă şi posibilitatea ca anticorpii umorali să nu atingă un nivel detectabil în cursul eliminării unei homo- sau heterografe. West şi Fowler (131) au constatat că γ-globulinele serice cresc în mod semnificativ la 10—12 zile după prelevarea homotransplantului renal la cîine, iar Paronetto şi colab. (96) au semnalat anticorpi circulanţi numai la 7 zile după homografarea ficatului.

Aşadar, γ-globulinele din vasele mici ale homotransplantelor de rinichi pot prezenta anticorpi umorali depozitaţi în mod selectiv, care fac parte din complexe antigen-anticorp. Ele dispar din secţiuni efectuate la criostat după tratament cu un tampon acid, despre care se ştie că dizolvă asemenea complexe (66). Împotriva denaturării prin acţiunea tamponului acid a γ-globulinelor localizate în pereţii vasculari pledează rezistenţa fluorescenţei γ-globulinelor celulare la un asemenea tratament (58). Ipoteza potrivit căreia γ-globulinele vasculare sînt constituente ale unor complexe antigen-anticorp este de asemenea sprijinită de fixarea locală a complementului (111) şi de similitudinea microscopică şi imunocitochimică dintre vasele mici din homografele renale şi vasele din zona fenomenului Arthus clasic, în care antigenele şi anticorpii sînt localizaţi în mod caracteristic (21, 112) şi sînt, în mod evident, responsabili de leziune. Kolker şi colab. (69) au reuşit să demonstreze, de altfel, că imunoglobuline renale capră-anti-iepure, marcate cu fluoresceină şi introduse intravenos la iepure, se localizează în primele minute după administrare în/pe celulele endoteliale vasculare şi în glomerulii renali.

Veith şi colab. (124), studiind caracteristicile fizice şi chimice ale proteinelor urinare la cîini cu homotransplant renal, au constatat că în urina provenind din rinichiul transplantat, concentraţia proteinelor poate atinge 30 mg/ml (faţă de 3,1 mg/ml în urina rinichiului autohton) şi că această creştere a excreţiei proteice se realizează pe seama β_2-globulinelor şi a γ-globulinelor. Studii imunoelectroforetice au confirmat prezenţa imunoglobulinelor în urina produsă de homotransplantele renale în curs de eliminare şi, în cantităţi mici, în urina provenind din rinichii receptorilor respectivi. Rezultatele preliminare ale unor cercetări ale aceloraşi autori (124) sugerează că aceste proteine au activitate citotoxică: dacă celule ale donatorului de rinichi sînt puse în contact *in vitro* cu proteinele din urina rinichiului transplantat, aflat în curs de eliminare se produce o inhibiţie a creşterii celulare de 50—75%. Activitate citotoxică s-a dovedit a avea, de altfel, şi unele fracţiuni proteice izolate din splină şi ficatul animalelor cu homotransplant renal (135).

Substanţele imunosupresoare de tipul azatioprinei (50—200 mg/zi) nu influenţează metabolismul proteic al oamenilor cu transplant renal. În schimb, prednisona (50—200 mg/zi) măreşte excreţia de azot la aceşti bolnavi (23). O influenţă deosebită asupra modificărilor metabolismului proteic în cursul eliminării homografelor renale exercită piridoxina (39) şi cisteina (59).

În homografele hepatice s-au pus în evidenţă de asemenea modificări ale proteinelor serice: creşterea precoce a α_2-globulinelor şi a γ-globulinelor şi scăderea albuminelor (96). Aceste modificări au fost descrise de altfel şi în alte tipuri de homografe (98, 100, 130, 131). Dar cele mai impresionante modificări ale acestor structuri proteice în homografele hepatice se produc tot în ţesut. γ-Globulinele pot fi evidenţiate în aceste homografe sub patru forme: prima

formă este reprezentată de γ-globulinele din plasmocite; cea de a 2-a formă este reprezentată de γ-globulinele din intima și media vaselor sanguine și din celulele epiteliale ale canalelor biliare (absența altor proteine serice în cazul acestei ultime localizări pledează împotriva exsudării); cea de a 3-a formă de γ-globuline, acelea prezente în macrofagele conținătoare de lipofuscină, este de asemenea expresia reacției imunologice; în sfîrșit, cea de-a 4-a formă este reprezentată de γ-globulinele care se află alături de alte proteine plasmatice în interiorul celulelor hepatice de la începutul eliminării, ilustrînd existența unei permeabilități anormale a membranei acestor celule.

Nu există alte date care să permită interpretarea acumulării γ-globulinelor în homografele hepatice decît acelea prezentate mai sus, o dată cu modificările γ-globulinelor din homografele renale.

b) **Mucopolizaharidele grefelor de piele.** Marckmann (80), studiind conținutul de apă, hexozamină, acid hexuronic și hidroxiprolină, precum și caracteristicile aminoacizilor colagenului din homografele de piele, a demonstrat că imediat după grefare are loc o evidentă acumulare de apă și hexozamină în țesut, paralelă cu scăderea concentrației de acid hexuronic și hidroxiprolină. Acest stadiu este urmat de o perioadă de acumulare considerabilă a mucopolizaharidelor acide în grefa de piele. Modificările menționate se reduc progresiv în intervalul de 50—100 de zile după transplantare.

În primele 5 zile după grefarea pielii, același autor (79) a pus în evidență reducerea captării ^{35}S-sulfatului în sulfomucopolizaharidele acestui țesut la șobolan, urmată de o creștere a captării ^{35}S-sulfatului, care poate dura peste 50 de zile. Aceste modificări ale încorporării ^{35}S-sulfatului în homografele de piele sînt considerate însă ca un răspuns nespecific al țesutului conjunctiv față de un factor nociv.

c) **Sinteza acizilor nucleici în țesuturile transplantate.** Acest aspect este, fără îndoială, cel mai important aspect metabolic al țesutului transplantat. Asupra sa sînt prezentate numeroase date în capitolul următor, privind inducerea imunotoleranței, dat fiind că el se leagă indisolubil de acțiunea majorității agenților imunosupresori. Cu această ocazie se subliniază numai cîteva observații cu privire la sinteza ADN, asupra cărora s-a insistat mai puțin.

În epiteliul transplantat privat temporar de aport sanguin, cum se întîmplă în grefele de piele de 6—8 ore care sînt dependente de difuziunea din surse de oxigen și metaboliți aflate la distanță, celulele se pot înmulți, dar ritmul de sinteză a ADN în aceste celule în cursul primelor 24 de ore este sub acela evidențiat în celulele epiteliale normale. Pe măsură ce se restabilește aportul sanguin în grefă, ritmul sintezei ADN în celulele sale crește progresiv și depășește ritmul de sinteză a acestui acid nucleic în țesuturile receptorului (73), stimularea acestui proces fiind pusă fie pe seama privațiunii relative inițiale de oxigen și metaboliți, fie pe seama reacțiilor biochimice pe care le implică refacerea celulară. Valorile maxime ale sintezei de ADN în autografe se ating la 5 zile după operație, după care ritmul de sinteză se apropie de valorile normale. S-a presupus că același proces are loc și în homografe, de îndată ce revascularizarea se realizează în același mod în ambele împrejurări. Există, totuși, indicații în sprijinul unui ritm mai crescut al sintezei ADN în homografe; după a 4-a zi de la transplantare, curba homografei deviază de la curba în declin a activității autografei și prezintă o creștere considerabilă a sintezei ADN asociată în mod

Scanned with OKEN Scanner

evident cu răspunsul imun (73). Datele disponibile în prezent nu oferă posibilităţi de explicare a ritmului crescut al sintezei ADN în celulele epiteliale ale homografelor. Acest fapt n-ar putea fi atribuit micilor modificări de revascularizaţie locală, pentru că chiar vasodilataţia pronunţată, realizată prin denervare, nu afectează în mod semnificativ marcarea acestor celule cu ^{3}H-timidină (73). De asemenea, nu se poate incrimina nici simpla hiperplazie compensatoare consecutivă morţii celulelor epiteliale ale homografei, dat fiind că proliferarea lor excesivă devine evidentă cu cîteva zile înainte ca celulele infiltrante ale gazdei să ajungă în apropierea celulelor sale epiteliale, fapt obligatoriu pentru ca, potrivit evidenţei actuale, să se producă distrugerea acestora (87, 134).

Stimulul pentru proliferarea celulară epitelială ar putea fi constituit de însăşi acumularea celulelor limfoide. S-a arătat recent că celulele limfoide sensibilizate specific, în concentraţii sub acelea care devin citotoxice, induc creşterea proliferării celulelor epiteliale ale grefei, cînd sînt cultivate împreună; chiar concentraţiile citotoxice de asemenea celule limfoide determină proliferarea celulelor epiteliale înainte de a le distruge (134).

S-au implicat şi anticorpii în stiumlarea proliferării celulelor homografei şi a sintezei ADN. Există o evidenţă considerabilă care asociază componenta efectorie a reacţiei imune cu proliferarea celulară. Atît antigenele, cît şi anticorpii pot exercita o acţiune mitogenică asupra celulelor: antigenele asupra celulelor sensibilizate specific faţă de ele (40, 57, 128) şi anticorpii asupra celulelor care evocă răspunsul imun (3, 48, 51, 101). Ficatul embrionului de găină creşte rapid cînd este expus antiserului heterolog respectiv [Weiss, citat de (73)], iar limfocitele în cultură suferă transformări şi diviziuni sub influenţa serului heterolog antilimfocitar (51). Proliferarea celulară splenică din reacţia grefă-contra-gazdă a fost explicată de Davies şi Doak (30), în acelaşi mod, dat fiind că celulele în acest caz s-au dovedit a avea originea în gazdă. Mai mult, în transplantarea tumorală, unde imunizarea activă a gazdei prin pretratament cu ţesut tumoral liofilizat sau viabil poate conduce în mod paradoxal la creşterea exagerată a transplantelor consecutive din tumoarea respectivă (fenomenul de potenţare sau facilitare, asupra căruia s-au prezentat date în alt capitol), a fost invocat de asemenea efctul stimulator al anticorpilor asupra proliferării celulare şi, implicit, asupra sintezei ADN (48, 67, 85). O acţiune a anticorpilor dependentă de concentraţie a fost de asemenea demonstrată în transplantarea tumorală, în care fenomenul de potenţare poate fi produs prin diluarea unor antiseruri care sînt inhibitoare şi distructive în concentraţii mari (49, 86). Ca atare, stimularea sintezei ADN în celulele epiteliale ale homografei ar putea avea loc sub acţiunea anticorpilor specifici, dar numai pînă în momentul în care aceştia depăşesc o anumită concentraţie (concentraţia citotoxică).

3. INFILTRAŢIA LIPIDICĂ

Intima vasculară din organele transplantate are un conţinut crescut de lipide. Barkan şi Silver (7) şi Porter (103) consideră că aceste lipide provin din trombocitele, bogate în lipide, care aderă la pereţii vaselor ţesutului transplantat şi sînt distruse.

Scanned with OKEN Scanner

4. ACTIVITATEA ENZIMATICĂ ÎN ŢESUTURILE TRANSPLANTATE

Una dintre cele mai precoce modificări în nefronii rinichiului homotransplantat este redistribuţia fosfatazelor acide şi pierderea activităţii β-glucosaminidazei în celulele tubilor proximali (62). Glomerulii suferă aceleaşi modificări, dar într-o măsură mai redusă.

Fosfatazele acide din rinichiul transplantat dau o reacţie mai slabă decît ţesutul renal normal şi inegală, iar prezenţa lor nu se poate evidenţia decît într-o parte din tubi, unde se dispun granular. Fosfatazele alcaline prezintă o reacţie foarte slabă, cu caracter difuz şi fără topografie caracteristică în rinichiul homotransplantat. Aceleaşi observaţii se pot face şi în legătură cu ATP-aza.

B. ASPECTE ALE METABOLISMULUI LEUCOCITELOR LA RECEPTORII DE ORGANE TRANSPLANTATE

Leucocitele au o activitate metabolică foarte complexă şi în acelaşi timp joacă un rol important în transportul anticorpilor antiţesut la organul transplantat, mediind astfel declanşarea procesului de eliminare a acestuia.

În ceea ce priveşte complexitatea metabolismului leucocitar, menţionăm lucrările lui Vesell şi Bearn (125) şi Dioguardi şi colab. (33), care au demonstrat că leucocitele umane conţin 4 sau, respectiv, 5 fracţiuni proteice diferite cu acţiune lacticodehidrogenazică, şi cercetările lui Beck şi Valentine (8—11), Delanuay şi colab. (31) şi Fallon şi colab. (35), care au evidenţiat în aceste celule o intensă activitate glicolitică aerobă şi anaerobă, precum şi o intensă activitate hexokinazică, fosfatazică şi decarboxilazică. Lucrările lui McKinney şi colab. (82) au adus dovezi asupra existenţei unui ciclu Krebs activ şi a succinoxidazei în leucocitul matur, iar lucrările efectuate de Luganova (77) au arătat că fosforilarea oxidativă este un proces important în această celulă. De asemenea, se menţionează cercetările lui Hardin şi colab. (54), ale lui Braunsteiner şi colab. (16, 17), ale lui Izak şi de Vries (61) şi Jochims (64), care au evidenţiat activitatea esterazică şi lipolitică în leucocite.

Rolul limfocitelor în transportul anticorpilor antiţesut este, aşa cum s-a arătat şi într-un capitol precedent, unanim recunoscut (18, 83, 91, 94). Baker şi colab. (6) au demonstrat că eliminarea unor tumori transplantate la şoareci se datoreşte mai ales intervenţiei macrofagelor. Weiser şi colab. (129) au incriminat aceleaşi celule în determinarea bolii alogeneice acute la această specie, iar Granger şi Weiser (50) au stabilit că limfocitelor peritoneale le lipseşte capacitatea pe care o au celelalte leucocite de a produce distrugerea zonală a unor culturi monostratificate de fibroblaşti. Dovezi suplimentare asupra rolului leucocitelor în transportul anticorpilor antiţesut s-au obţinut şi din unele studii privind eliminarea homografelor tumorale (3—5, 46, 47, 95). Kopp (70) a publicat observaţii foarte sugestive în legătură cu mecanismele transportului leucocitar de anticorpi: cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi, el a demonstrat că proteinele serice aderă de suprafaţa leucocitelor spălate complet, fapt foarte important pentru evaluarea investigaţiilor imunologice în care se folosesc aceste elemente figurate sanguine. Observaţiile lui Danaher şi colab. (24) şi ale lui Hartman şi Hoch (55) sînt concordante cu acelea ale lui Kopp (70).

Scanned with OKEN Scanner

Pe de altă parte, izoantigenicitatea antigenelor leucocitare de suprafață, evidențiată prin antiseruri leucoaglutinante obținute de la bolnavi care au primit transfuzii multiple (25) sau de la femei multipare (99, 121), a fost demonstrată chiar la gemeni homozigoți (27), ca și în alte studii genetice, care au condus la concluzia existenței grupelor leucocitare (26, 28, 121—123). Leucocitele s-au dovedit a conține antigene de transplantare la oameni și multe alte specii (22, 29, 42, 106, 123).

Însă, date care să permită aprecierea implicațiilor metabolismului leucocitar în activitatea lor antigenică și de transport al anticorpilor antițesut sînt puțin numeroase. Astfel, la cîini cu homotransplant renal heterotopic, netratați cu vreun agent imunosupresor, s-au putut face următoarele observații, care par a avea o semnificație deosebită (97): a) leucocitele izolate din sîngele periferic își reduc progresiv capacitatea de a oxida izocitratul (fig. 72) și glutamatul (fig. 73), atingînd valorile minime la 9—12 zile după transplantare; b) perioada de inhibiție a oxidării acestor două substraturi este urmată de o perioadă de stimulare a oxidării lor, precum și a α-cetoglutaratului (fig. 74) și a succinatului (fig. 75), atingînd valorile maxime la 21—25 de zile de la transplantare; c) DNF nu influențează capacitatea leucocitelor izolate din sîngele periferic după transplantare de a oxida izocitratul și glutamatul, inhibează oxidarea α-cetoglutaratului și stimulează oxidarea succinatului, intensitatea maximă a fenomenului din urmă înregistrîndu-se după 9—12 zile de la transplantare (fig. 72—75); d) limfocitele splenice oxidează mai slab izocitratul și succinatul după transplantare, efectul stimulator al DNP asupra oxidării succinatului fiind de asemenea evident (fig. 76); e) activitatea dehidrogenazică a leucocitelor periferice se reduce după transplantare, fenomen însoțit de activarea esterazelor nespecifice, cu nivel maxim la 9—12 zile postoperator (tabelul 29).

Dat fiind că, exceptînd celulele tumorale din lichidul de ascită, leucocitele sînt probabil singurele celule nucleate, care se află suspendate liber într-un mediu lichid, ceea ce face ca ele să fie izolate cu ușurință, numărate corect și, mai ales, să poată fi supuse unor studii *in vitro* care reproduc îndeaproape condițiile existenței lor *in vivo* (8), se poate afirma despre observațiile de mai sus că ele reprezintă fenomene leucocitare reale, neartificializate, din evoluția procesului imunologic de transplantare.

Este de remarcat faptul că modificările metabolice menționate ale leucocitelor din sîngele periferic și ale limfocitelor splenice sînt mai intense în perioada postoperatorie de 9—12 zile, care coincide, potrivit datelor lui Gombos și colab. (44) și Fisher și colab. (38) cu ultima fază a eliminării homotransplantului renal.

Așadar, eliminarea organului transplantat se însoțește de apariția unor modificări depresive ale metabolismului oxidativ leucocitar, condiționate de tulburări de esterificare fosfatică a substratului. ATP și alți acceptori și surse de fosfat pot fi folosiți în alte procese, cum ar fi sinteza proteică (sau de anticorpi). Inhibiția oxidării substraturilor din ciclul Krebs de către leucocitele periferice și limfocitele splenice după transplantare nu poate fi o inhibiție de substrat, dat fiind că rezultatele menționate au fost obținute pe celule intacte, care, conform datelor lui McKinney și colab. (82), nu-și modifică ritmul respirator în prezența citratului, α-cetoglutaratului, succinatului, fumaratului, mala-

Scanned with OKEN Scanner

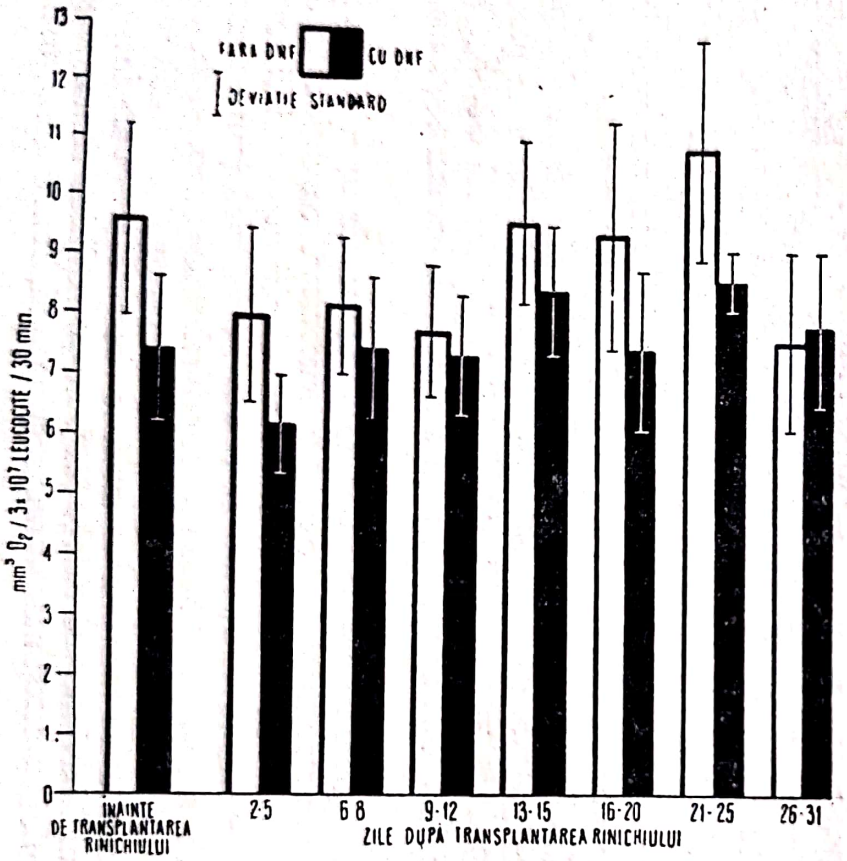


Fig. 72. — Oxidarea izocitratului în absența și prezența DNF de către leucocitele izolate din sîngele periferic al cîinilor cu homotransplant renal.

Fiecare vas Warburg a conținut: tampon fosfat pH 7,4—30 µmol, izocitrat — 10 µmol, ATP — 3 µmol, NAD — 2 µmol, $MgCl_2$ — 20 µmol, suspensie leucocitară — 0,5 ml (3×10^7 leucocite); în compartimentul central: KOH 5N — 0,2 ml. Pentru inhibiție s-a folosit DNF — 2 µmol pentru conținutul unui vas. Volumul total de reacție: 2 ml. Preincubație: 15 minute cu amestec de O_2 (94%) și CO_2 (6%). Fiecare valoare reprezintă media rezultatelor a 10 experiențe. Date personale.

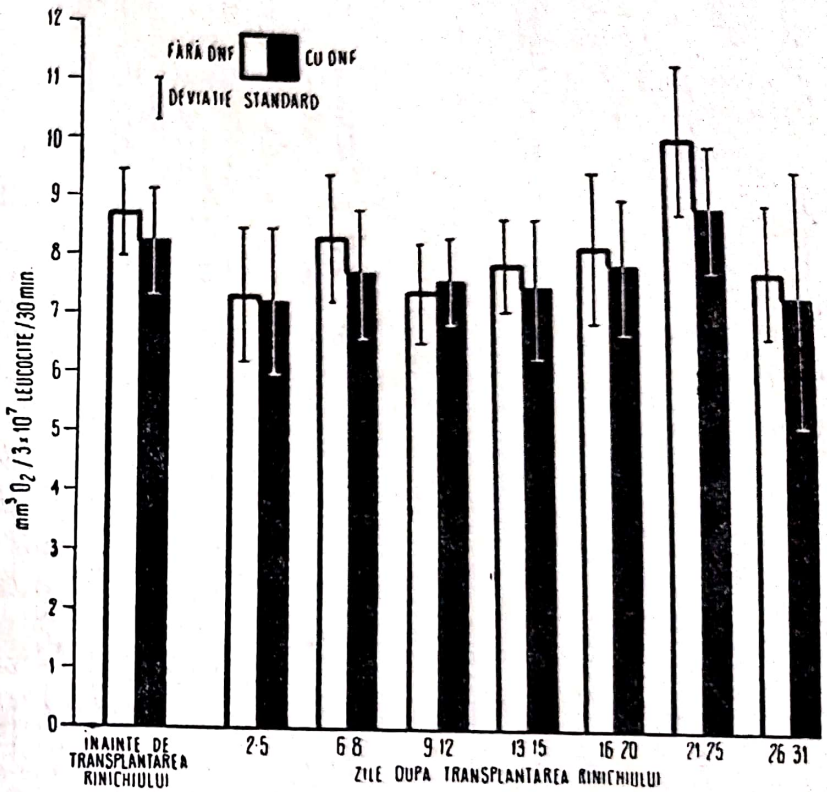


Fig. 73. — Oxidarea glutamatului în absența și prezența DNF de către leucocitele izolate din sîngele periferic la cîini cu homotransplant renal.

Condițiile măsurătorilor au fost identice cu acelea menționate la figura 12, cu excepția cantității de substrat (glutamat — 20 µmol) (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

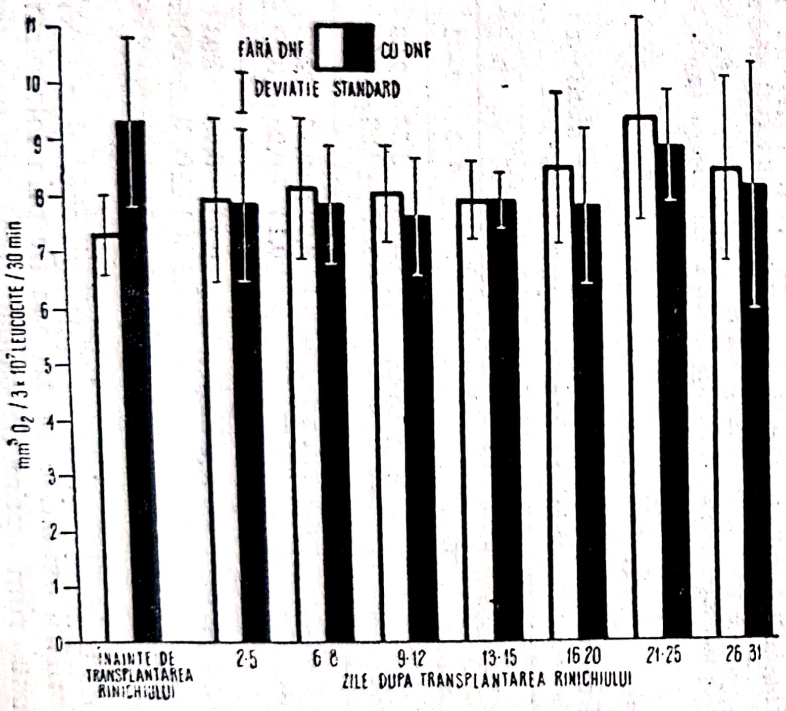


Fig. 74. — Oxidarea α-cetoglutaratului in absența și în prezența DNF de către leucocitele izolate din sîngele periferic la cîini cu homotransplant renal.

Condițiile măsurătorilor au fost identice cu acelea menționate la figura 72, cu excepția cantității de substrat (α-cetoglutarat — 20 µmol) (date personale).

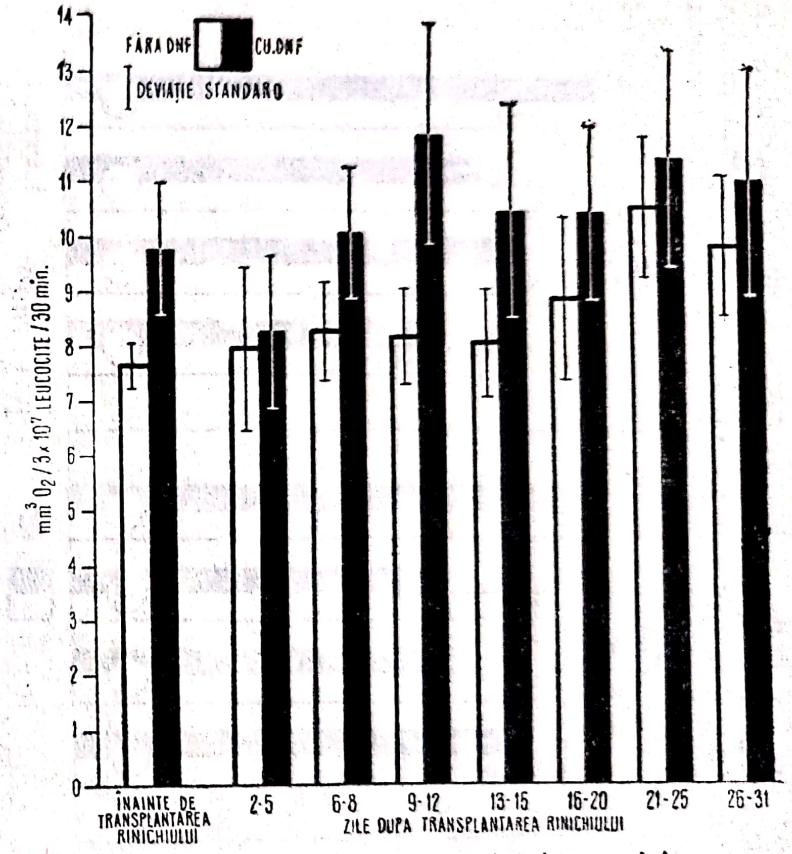


Fig. 75. — Oxidarea succinatului în absența și în prezența DNF de către leucocitele izolate din sîngele periferic la cîini cu homotransplant renal.

Condițiile măsurătorilor au fost identice cu acelea menționate la figura 72, cu excepția cantității de substrat (succinat — 20 µmol) (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

tului, oxaloacetatului sau glutamatului în exces. Comportamentul leucocitelor în amestecul de reacţie care conţine DNF justifică de asemenea presupunerea că tulburarea primară a metabolismului oxidativ leucocitar după transplantarea

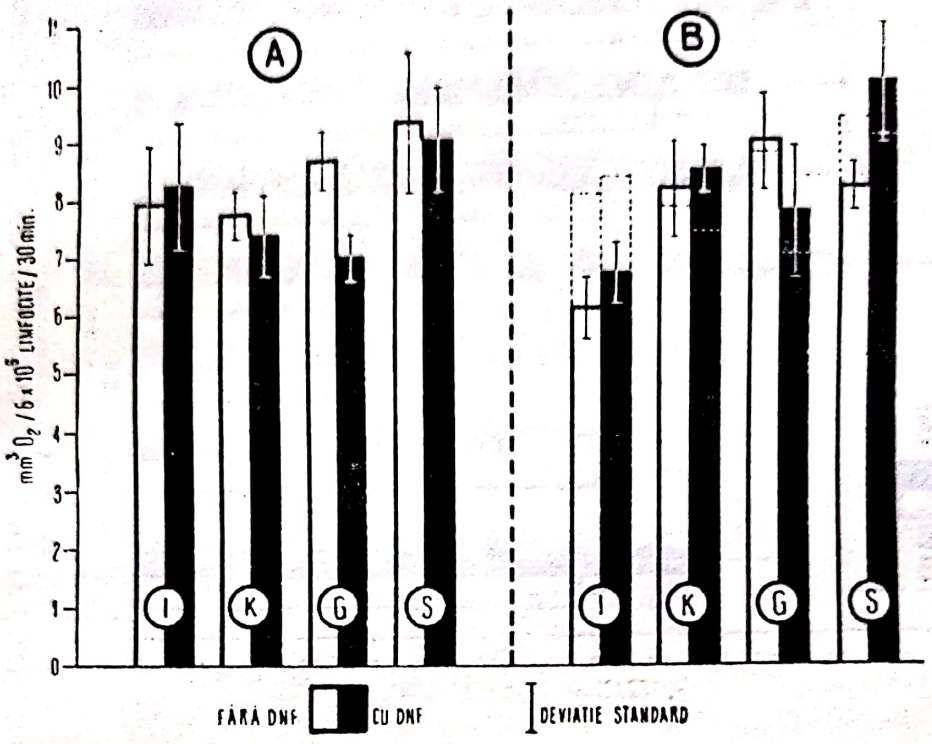


Fig. 76. — Oxidarea izocitratului (*I*), a α-cetoglutaratului (*K*), a glutamatului (*G*) şi a succinatului (*S*), în absenţa şi în prezenţa DNF, de către limfocitele splenice izolate de la cîini normali (*A*) şi cîini cu homotransplant renal (*B*).

Condiţiile măsurătorilor au fost identice cu acelea menţionate în figurile 72—75 (date personale).

Tabelul 29

Activitatea dehidrogenazică şi colinesterazică a leucocitelor izolate din sîngele periferic la cîini cu homotransplant renal *

Enzima	Control	Zile după transplantarea rinichiului					
		2—5	6—8	9—12	13—15	16—20	21—31
Dehidrogenaza lactică (u.i./6×10⁶ leucocite)	2,68±0,20	3,66 ±0,22	3,56 ±0,28	2,39 ±0,37	1,59 ±0,67	2,63 ±0,36	1,97 ±0,35
Dehidrogenaza succinică (u.i./6×10⁶ leucocite)	4,25±0,20	3,99 ±0,14	2,85 ±0,20	2,92 ±0,20	2,50 ±0,54	2,48 ±0,36	2,18 ±0,36
Colinesteraza (unităţi pH)	0,50±0,05	0,46 ±0,09	0,73 ±0,08	0,93 ±0,09	0,70 ±0,15	0,70 ±0,05	0,60 ±0,31

* Fiecare cifră reprezintă media rezultatelor a 10 determinări [după Păuşescu şi colab. (97)].

rinichiului este decuplarea parţială a fosforilării oxidative. DNF, acest decuplant specific al fosforilării oxidative, ar acţiona fie prin înlocuirea fosforului anorganic necesar unui ritm optim de oxidare (76), fie prin dirijarea fosforului

Scanned with OKEN Scanner

anorganic spre lanțul respirator (13), fie, în sfîrșit, prin scindarea unui produs intermediar (conținînd fosfor anorganic) al fosforilării exsudative (65, 118). Tulburările metabolismului oxidativ leucocitar după homotransplantarea rinichiului par a avea, așadar, caracterul unei inhibiții de tipul celei produse de DNF. În leucocitele periferice și limfocitele splenice sînt încorporați anticorpii antițesut. Nu este exclus ca sinteza acestor anticorpi să fie definitivată în însuși interiorul acestor celule, cu atît mai mult, cu cît s-a stabilit că timpul de sinteză a unei molecule proteice este de ordinul minutelor (12, 56). Cum sinteza proteinelor implică intervenția ATP (aminoacid + ATP + enzimă → proteină), în noul echilibru dinamic celular potențialul fosforilant pare a fi utilizat preferențial în acest proces. Transferul de imunitate prin incubarea splenocitelor receptorului cu ARN extras din limfocitele donatorului în cazul homografelor de piele (78) sau cu extracte leucocitare tratate cu DNA-ază (74) s-a dovedit a fi posibil, or este cunoscut faptul că acizii nucleici au un rol important în sinteza proteinelor și, deci, a anticorpilor (2, 14, 15, 19, 36). Aceste observații atestă ritmul crescut al sintezei proteice în leucocite în imunitatea de transplantare și se înscriu în linia interpretării pe care noi o dăm modificării metabolismului oxidativ al acestor celule după homotransplantarea rinichiului la cîine.

Ar putea părea paradoxal ca un inhibitor enzimatic să stimuleze desfășurarea unei etape metabolice (este cazul acțiunii DNF asupra oxidării succinatului de către leucocitele periferice și limfocitele splenice), dar s-a stabilit pe baza a numeroase observații că acest fapt se întîlnește destul de des și că el ar fi provocat de: a) înlăturarea sau inactivarea unei substanțe inhibitoare (acest tip de stimulare fiind pus în evidență mai frecvent pe preparate de celule dezintegrate); b) alterarea debitului metabolic în sistemele enzimatice multiple; c) reducerea concentrației unei anumite enzime; d) inversarea unui echilibru dinamic; e) depresiunea unei reacții de reglare metabolică (75).

Cînd leucocitele din sîngele periferic și limfocitele izolate din splină, folosite în studiu, sînt întregi, primul tip de stimulare menționat nu pare a fi plauzibil pentru DNF. Mai curînd efectul stimulator al acestei substanțe asupra oxidării succinatului [care este dovada decuplării fosforilării oxidative (13)] de către leucocitele periferice sau limfocitele splenice după transplantarea unui rinichi ar putea fi explicat prin reducerea concentrației sau a activității dehidrogenazei succinice. În anumite circumstanțe, creșterea activității unei enzime mărește ritmul procesului metabolic respectiv numai pînă la un anumit punct, după care ritmul se încetinește și, invers, dacă în celulă concentrația enzimatică este pe cale de scădere, scăderea suplimentară indusă de un inhibitor enzimatic poate avea un efect secundar stimulativ. Fenomenul a fost demonstrat de Straub (117) pentru dehidrogenaza lactică și este, probabil, un fenomen general în cazul unor enzime similare. De asemenea pare plauzibilă explicarea acțiunii stimulatoare a DNF asupra oxidării succinatului la animalele cu homotransplant renal prin modificarea amintită mai sus a echilibrului dinamic celular.

Cum sinteza proteică celulară (aminoacizii + ATP + enzimă → proteină) este dublată de o distrugere proteică celulară simultană (proteină + enzimă → → aminoacizi), echilibrul dinamic dintre aceste procese poate fi tulburat de orice inhibitor al uneia dintre aceste reacții. Dacă formarea de ATP este deprimată, cum se întîmplă în prezența DNF, proteoliza poate deveni proces dominant,

Scanned with OKEN Scanner

iar echilibrul dinamic se modifică. Dat fiind că succinatul poate proveni din izoleucină, valină, metionină, acid α-aminobutiric, acid propionic şi din cei trei atomi de carbon terminali ai acizilor graşi cu un număr impar de atomi de carbon (71), se poate afirma că în prezenţa DNF substratul se îmbogăţeşte pe seama acestor aminoacizi şi a acestor acizi graşi care ar putea intra în constituţia anticorpilor de transplantare într-o proporţie însemnată. Activitatea esterazică crescută a leucocitelor periferice după transplantarea rinichiului poate fi corelată cu nevoile de remaniere a echilibrului dinamic celular determinate de transportul sau sinteza parţială a anticorpilor antiţesut. Capacitatea celulei vii de a-şi ajusta metabolismul la circumstanţe ambiante diferite se realizează prin implicarea tuturor sau a celor mai multe dintre sistemele sale metabolice.

C. MODIFICĂRI UMORALE ALE RECEPTORILOR DE ORGANE TRANSPLANTATE

1. MODIFICĂRILE PROTEINELOR PLASMATICE

Hardin şi colab. (53) au semnalat apariţia unor concentraţii crescute de α-globuline în serul şoarecilor C3H purtători de homografe de piele în curs de eliminare şi au interpretat această modificare umorală ca o reacţie nespecifică, posttraumatică şi postinflamatoare. Dat fiind că homografele de piele generează anticorpi circulanţi de tipuri diverse şi că γ-globulinele serice pot să nu fie crescute în mod evident în cursul formării anticorpilor, Peacock şi Biggers (100) au considerat că creşterea α-globulinelor serice poate fi rezultatul producerii de anticorpi specifici. În experienţe asupra homo- şi heterotransplantelor de piele la şoareci C57 şi C3H, ei au constatat că α-globulinele serice cresc mai mult la animalele cu homotransplant secundar sau cu heterotransplant decît la animalele cu homotransplant primar şi că ele scad imediat ce se face excizia ţesutului transplantat. Însă potrivit părerii lui Pressman (105), dacă imposibilitatea de a demonstra existenţa unor anticorpi specifici circulanţi în cursul eliminării transplantelor de ţesuturi s-ar datori concentrării acestor anticorpi în ţesutul transplantat sau în patul transplantului şi dacă aceşti anticorpi ar fi situaţi în α-globuline, ar însemna că înlăturarea transplantului să fie urmată, cel puţin temporar, de acumularea lor în sînge. De aceea pare mai plauzibilă presupunerea lui Mitchison şi Dube (84), care socotesc că creşterea concentraţiei α-globulinelor în ser după transplantarea unor ţesuturi străine este răsunetul creşterii producţiei pe hemaglutinine, care nu se asociază cu anticorpii tisulari, responsabili de eliminarea acestor ţesuturi.

Investigaţii personale asupra modificărilor polarografice ale plasmei la cîini cu rinichii proprii conservaţi şi homotransplant renal heterotopic au evidenţiat cîteva modificări în comportamentul electrochimic al proteinelor plasmatice şi anume: a) intensitatea curentului de difuziune scade în mod evident începînd de la 9—12 zile după transplantarea rinichiului; b) scăderea intensităţii curentului de difuziune se însoţeşte în această perioadă de reducerea treptei a doua a curbei polarografice, care se menţine peste 20 de zile după operaţia de transplantare; c) valorile curentului de difuziune înregistrate la cele două probe-martor (control alcalin şi control neutru) se inversează în cursul perioadei în

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 30

Amplitudinea (T) a curbei curentului de difuziune (mm) în probe de plasmă provenind de la cîini cu homotransplant renal, determinată prin aplicarea unui curent electric cu tensiune progresiv crescîndă la electrodul de mercur al polarografului *

Momentul prelevării sîngelui		Control neutru		Control alcalin		Probă	
		T	T_2-T_1	T	T_2-T_1	T	T_2-T_1
Înainte de transplantarea rinichiului		38,1±3,5	7,1±1,2	28,8±2,2	4,2±1,2	29,6±3,1	3,8±0,7
După transplantarea rinichiului (zile)	2— 5	35,1±2,9	4,1±0,6	32,4±2,1	4,0±0,7	28,7±2,9	4,2±0,8
	6— 8	31,0±2,8	3,8±0,7	32,0±3,0	5,1±0,9	27,8±3,3	4,0±1,1
	9—12	28,5±3,1	3,1±0,9	35,4±2,6	3,8±1,0	24,0±2,5	2,5±0,6
	13—15	25,0±2,5	3,0±0,4	34,0±2,9	4,0±0,9	22,6±2,7	0,6±0,4
	16—20	28,8±2,7	2,7±0,7	34,4±3,1	3,0±0,5	24,1±2,4	1,0±0,3
	21—25	38,3±2,7	2,8±0,4	34,6±2,9	2,0±0,4	33,0±3,1	3,7±0,9
	26—30	38,0±3,3	4,0±1,1	34,8±3,2	3,0±0,6	36,0±3,4	2,5±0,7

* T_1 și T_2 sînt respectiv, unda întîia și unda a doua a curbei polarografice. Fiecare valoare reprezintă media rezultatelor a 20 de experiențe (date personale).

care se evidențiază modificările electrochimice menționate (tabelul 30). În figura 77 sînt ilustrate modificările curbelor polarografice ale plasmei la un cîine cu homotransplant renal. Concomitent cu aceste modificări nivelul plasmatic al seromucoidului acid α_1 s-a dovedit a scădea progresiv, atingînd valorile minime la 21—25 de zile după transplantarea rinichiului (fig. 78). Este de remarcat faptul că atît modificările comportamentului electrochimic al plasmei, cît și variațiile concentrației seromucoidului acid α_1 în plasmă, dublează perioada de eliminare a rinichiului transplantat, care se înfăptuiește, potrivit datelor lui Dempster și Hume [citați de (63)], în primele 2—14 zile postoperator și se agravează pe măsură ce acest proces se intensifică. Modificările acestor parametri sînt de durată și sînt, în mod evident, strîns legate de procesul imunologic pe care-l implică eliminarea unui organ transplantat. Deși există date care sprijină părerea că anticorpii circulanți convenționali nu sînt participanți obligatorii în eliminarea homografelor tisulare (113), se pare că asemenea anticorpi sînt eliberați în mod constant după transplantarea țesuturilor (1). Modificarea evidentă și de durată a nivelului plasmatic al seromucoidului acid α_1, legătura strînsă dintre această mucoproteină și fracțiunea α_1-globulinică din plasmă, alături de datele lui Nelson (94), care a arătat că pe măsură ce procesul de eliminare a organismului transplantat se desfășoară, titrul anticorpilor circulanți scade, sugerează că acești anticorpi nu au un rol neglijabil în acest proces. Potrivit cercetărilor lui Prasad și Poulik (104), polarogramele fracțiunilor pure de proteine plasmatice sînt caracteristice pentru fiecare în parte și orice schimbare care intervine în raportul dintre aceste fracțiuni are repercusiuni asupra curbei polarografice, ceea ce explică modificarea imediată a acestui parametru în cursul eliminării homotransplantului renal.

Observațiile de mai sus sînt concordante cu rezultatele unor investigații electroforetice personale asupra plasmei prelevate de la cîini cu auto- și homotransplant renal, primar și cu rezultatele obținute de alți autori (52, 53, 98, 131) pe alte modele experimentale. Aceste investigații au permis evidențierea scăderii

Scanned with OKEN Scanner

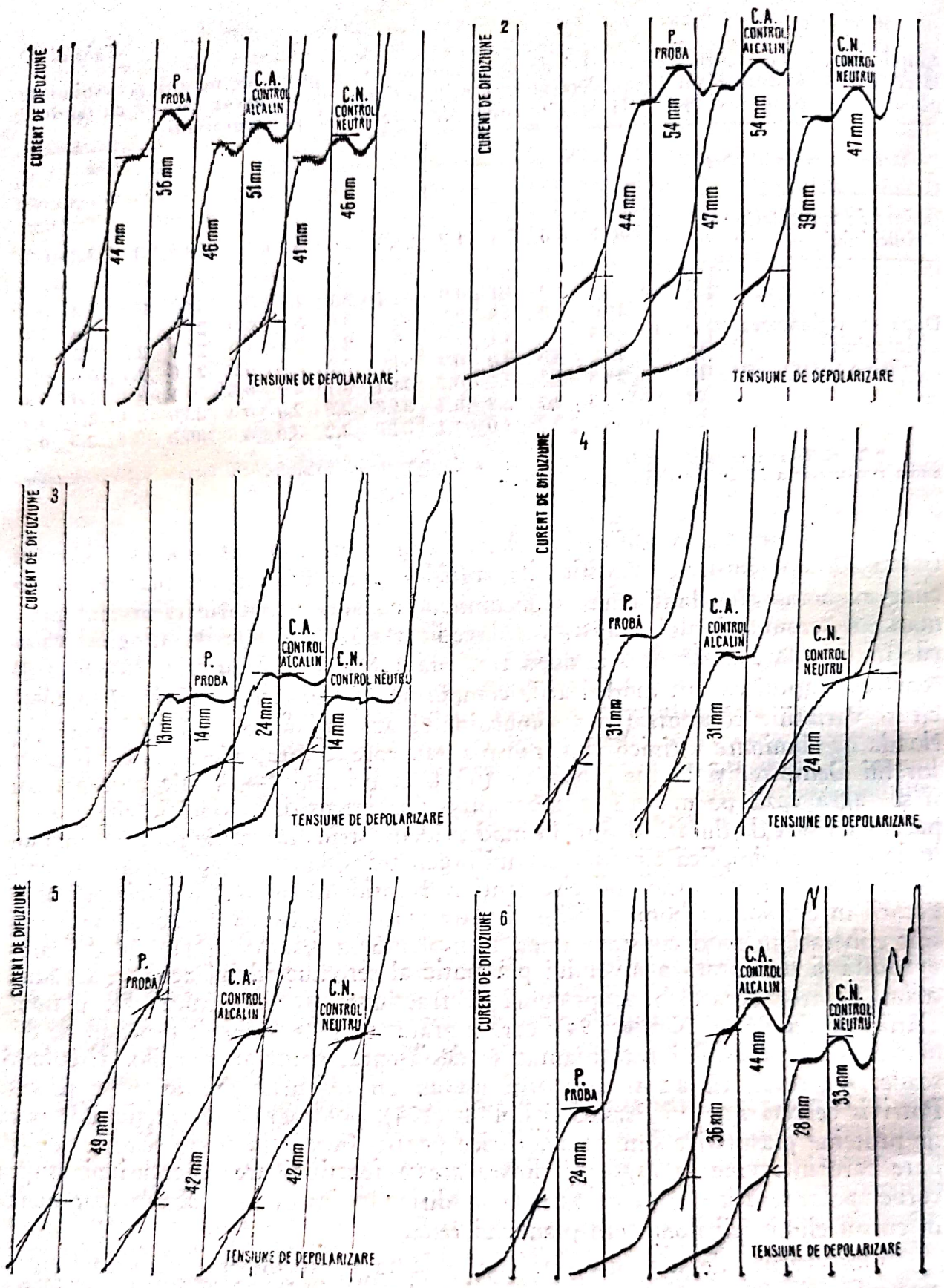


Fig. 77. — Modificările curbelor polarografice la un cîine cu homotransplant renal.

Curbele au fost înregistrate în următoarele momente: 1) înainte de operație; 2) la 2—5 zile după operație; 3) la 6—8 zile după operație; 4) la 9—12 zile după operație; 5) la 16—20 de zile după operație; 6) la 26—31 de zile după operație (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

concentrației albuminelor, a creșterii concentrației α_1-globulinelor și, mai ales, a α_2-globulinelor și a creșterii, mai puțin semnificative, a γ-globulinelor în plasma cîinilor cu homotransplant renal (tabelele 31 și 32).

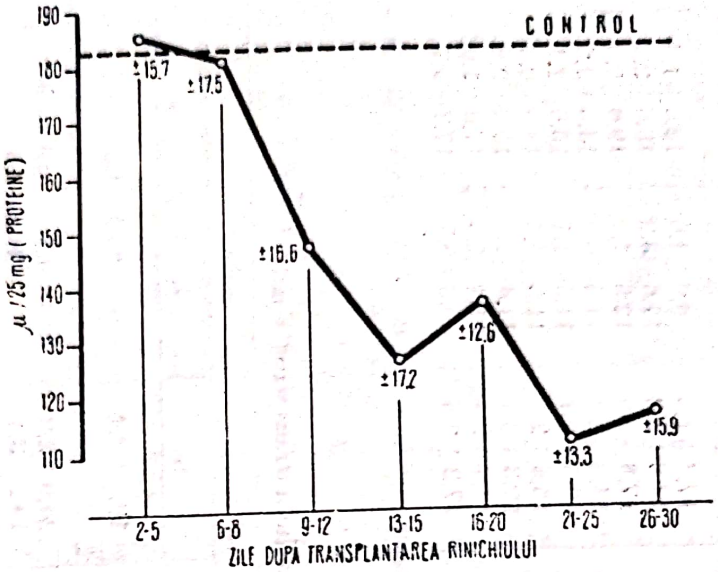


Fig. 78. — Variațiile nivelului plasmatic al seromucoidului acid α_1 la cîini cu homotransplant renal (date personale).

2. VARIAȚIILE CONCENTRAȚIEI MUCOPOLIZAHARIDELOR ȘI A TRIPTOFANULUI DIN PLASMĂ

Creșterea concentrației sanguine a mucopolizaharidelor și triptofanului, care durează peste 30 de zile după transplantare, nu are un caracter specific, dat fiind că ea se produce atît la animalele cu homotransplant renal, cît și la acelea cu autotransplant renal (tabelul 33).

3. MODIFICĂRI ALE ACTIVITĂȚII UNOR SISTEME ENZIMATICE

După homostransplantarea rinichiului a fost semnalată creșterea activității LDH în ser. Activitatea LDH în ser poate reflecta activitatea celulară renală, alături de a celorlalte organe. Activitatea acestei enzime crește moderat în iminența de eliminare a homotransplantului renal și în mod marcat în cursul crizelor acute de rejecție (fig. 79). Formele moleculare multiple ale LDH (izozimele I—V) au fost de asemenea cercetate în urina și sîngele bolnavilor cu homotransplant renal. În mod normal, în aceste umori se află numai izozimele I—III, dar în cursul iminenței de eliminare a țesutului renal pot fi detectate în urină și sînge în cantități mari izozimele IV și V. Aceste modificări cantitative și calitative ale LDH pot fi folosite în diagnosticul de iminență de eliminare. Ele au un caracter reversibil: terapia imunosupresoare le corectează (60). Creșterea activității LDH după homotransplantare nu are specificitate de țesut; ea poate avea loc și după transplantarea inimii sau a mușchiului.

Tabelul 31

Variaţiile unor proteine plasmatice la câini cu autotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Proteine totale (g/100 ml)	Albumine	Globuline				
				α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Înainte de transplantarea rinichiului		6,76±0,2	34,3±1,9	4,7±0,1	16,4±0,1	9,3±0,1	16,9±0,3	19,2±1,2
După transplantarea rinichiului (zile)	1— 3	6,55±0,2	28,0±2,6	5,1±0,2	17,4±1,8	9,9±1,0	18,0±1,4	19,8±1,9
	4— 6	6,23±0,1	33,7±1,9	4,7±0,2	14,8±1,2	17,6±3,2	18,0±2,9	19,7±1,4
	7— 9	6,68±0,2	29,6±1,3	4,3±0,2	17,8±2,9	12,5±1,1	19,0±0,3	20,8±3,2
	10—13	6,61±0,2	32,5±2,6	5,8±1,6	14,8±2,4	11,5±0,5	14,5±0,5	20,6±1,0
	14—16	6,75±0,1	31,8±2,1	4,1±0,4	17,5±2,1	11,5±1,1	15,0±1,1	19,0±2,9
	17—20	6,24±0,2	34,9±1,5	4,8±0,9	15,6±2,1	11,5±0,5	16,0±0,3	17,0±1,6
	21—24	6,23±0,7	31,5±2,0	4,7±0,6	19,3±3,1	11,4±1,1	15,3±2,9	18,1±1,9
	25—28	6,64±0,3	32,4±2,1	5,5±0,3	14,4±2,1	11,4±0,3	17,6±1,03	20,8±1,5
	29—32	6,76±0,3	29,4±2,4	5,1±0,2	17,2±2,8	9,8±0,7	17,7±0,7	22,7±1,4

* Albuminele şi fracţiunile globulinice sînt exprimate în procente. Fiecare valoare reprezintă media rezultatelor a 10 experienţe (date personale).

Tabelul 32

Variaţiile unor proteine plasmatice la câini cu homotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Proteine totale (g/100 ml)	Albumine	Globuline				
				α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Înainte de transplantarea rinichiului		7,95±0,1	37,6±3,1	4,3±0,4	16,3±2,4	25,1±1,5		17,1±2,6
După transplantarea rinichiului (zile)	1— 3	7,29±0,1	34,2±1,4	4,7±1,6	20,0±2,2	12,3±0,4	15,3±0,4	15,0±1,1
	4— 6	6,16±0,4	33,0±2,1	4,5±0,8	19,2±3,4	26,0±2,6		16,2±2,8
	7— 9	6,77±0,5	34,0±1,2	5,5±1,1	14,0±2,6	16,0±1,4	11,5±2,1	17,3±1,5
	10—13	7,44±0,4	33,1±1,3	4,0±0,6	14,6±2,5	16,4±1,9	14,3±0,8	18,5±1,5
	14—16	7,20±0,4	32,8±2,7	3,9±0,1	12,0±0,6	12,9±4,4	15,3±5,5	18,0±1,0
	17—20	7,59±1,8	30,7±2,0	4,7±0,4	15,1±0,8	11,7±0,9	11,6±1,1	22,6±0,7
	21—24	7,74±3,3	27,8±2,2	3,8±0,8	11,0±5,9	13,5±2,0	12,1±1,2	24,5±2,9
	25—28	7,85±0,4	29,8±4,7	3,5±1,0	7,5±3,7	11,5±2,3	17,5±6,9	23,8±7,1
	29—32	8,06±2,7	25,7±2,5	4,5±0,8	15,5±0,7	11,8±2,2	11,7±1,7	22,2±2,7

* Albuminele şi fracţiunile globulinice sînt exprimate în procente. Fiecare valoare reprezintă media rezultatelor a 15 experienţe (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 33

Variaţiile concentraţiei sanguine a mucopolizaharidelor şi a triptofanului la cîini cu auto- şi homotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Homotransplant		Autotransplant	
		Mucopolizaharide (u. fotom.)	Triptofan (g/1 000 ml)	Mucopolizaharide (u. fotom.)	Triptofan (g/1 000 ml)
Înainte de transplantarea rinichiului		22,07±1,48	1,65±0,1	22,50±1,96	1,68±0,2
După transplantarea rinichiului (zile)	1— 3	35,20±7,28	1,57±0,1	49,00±2,08	1,45±0,3
	4— 6	34,11±2,60	1,58±0,1	49,33±6,66	1,26±0,1
	7— 9	39,20±6,57	1,61±0,2	—	—
	10—13	37,43±2,65	1,47±0,1	42,80±2,22	1,61±0,1
	14—16	39,20±5,35	1,49±0,1	40,10±5,60	1,65±0,2
	17—20	36,87±4,28	1,51±0,1	39,25±2,75	1,56±0,1
	21—24	34,12±4,06	1,60±0,1	35,50±3,50	1,67±0,1
	25—28	31,87±3,32	1,73±0,1	37,33±4,34	1,76±0,1
	29—32	29,88±2,97	1,32±0,1	36,80±2,13	1,86±0,1

* Loturile experimentale au fost constituite din 15 cîini cu homotransplant renal şi 10 cîini cu autotransplant renal (date personale).

Variaţiile postoperatorii ale activităţii fosfatazelor alcaline şi a aldolazei în plasmă după homotransplantarea rinichiului nu sînt specifice procesului de eliminare, pentru că ele sînt paralele variaţiilor activităţii aceloraşi enzime în plasma cîinilor cu autotransplant renal (tabelul 34).

Transplantarea ficatului este urmată de creşterea bilirubinemiei şi a activităţii SGOT şi a fosfatazei alcaline în ser, atît la animale (fig. 80), cît şi la om (fig. 81). Creşterea activităţii SGOT poate ajunge la 400—2 000 unităţi S-F (88, 115). Aceste modificări au un caracter ciclic, care pare a fi condiţionat de insuficienţa funcţională iniţială a organului transplantat şi de evoluţia ulterioară a procesului de eliminare. Ele sînt asociate cu o uşoară scădere a fibrino-

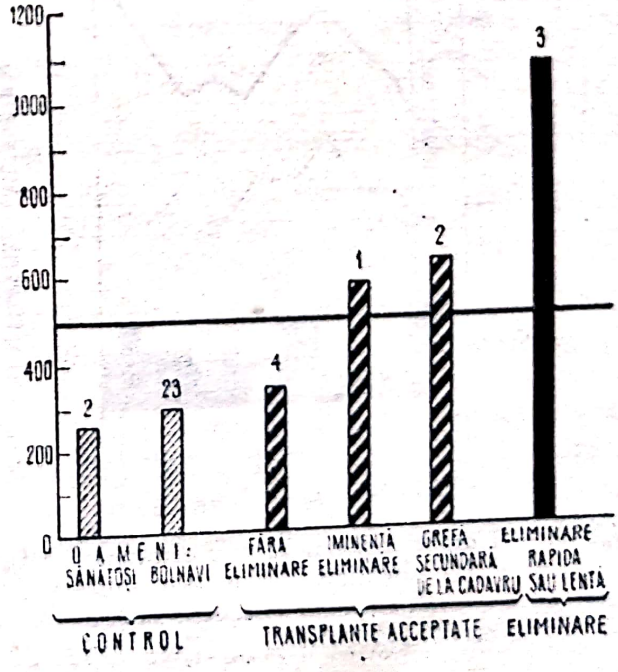


Fig. 79. — Valorile medii ale activităţii LDH în serul a trei grupe de bolnavi.

Linia continuă reprezintă cele mai ridicate valori normale care au fost constatate. Valoarea medie a grupelor de control este mult sub această linie. Toţi bolnavii la care rejecţia rinichiului homotransplantat nu s-a produs au prezentat valori ale activităţii LDH în ser statistic nediferite de valorile normale. Bolnavii la care rinichii homotransplantaţi au funcţionat, dar au fost în repetate rînduri în iminenţă de rejecţie, au prezentat valori ridicate ale activităţii LDH în ser. La bolnavii cu rinichi homotransplantaţi rejectaţi rapid sau lent, aceste valori au fost considerabil crescute, acest fenomen fiind observat chiar în perioadele în care funcţia renală nu a fost afectată în mod deosebit [după Hume şi colab. (60)].

Scanned with OKEN Scanner

rioară a procesului de eliminare. Ele sînt asociate cu o

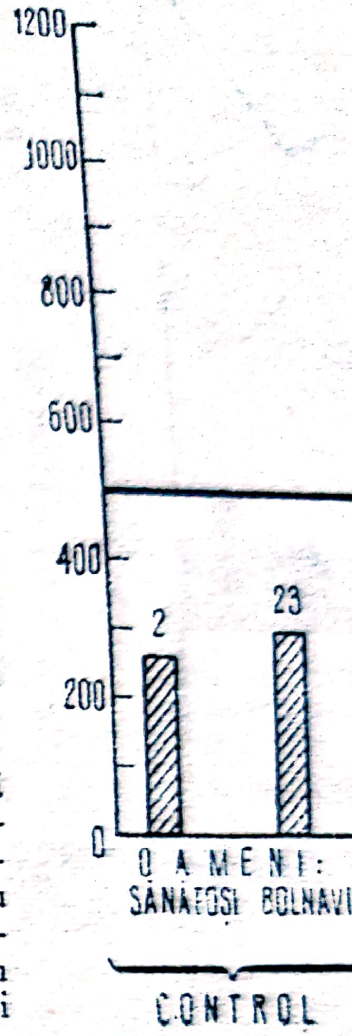


Fig. 79. — Valorile medii ale activității LDH în serul a trei grupe de bolnavi.

Linia continuă reprezintă cele mai ridicate valori normale care au fost constatate. Valoarea medie a grupelor de control este mult sub această linie. Toți bolnavii la care rejecția rinichiului homotransplantat nu s-a produs au prezentat valori ale activității LDH în ser statistic nediferite de valorile normale. Bolnavii la care rinichii homotransplantați au funcționat, dar au fost în repetate rînduri în iminență de rejecție, au prezentat valori ridicate ale activității LDH în ser. La bolnavii cu rinichi homotransplantați rejectați rapid sau lent, aceste valori au fost considerabil crescute, acest fenomen fiind observat chiar în perioadele în care funcția renală nu a fost afectată în mod deosebit [după Hume și colab. (60)].

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 34

Variaţiile activităţii fosfatazelor alcaline şi a aldolazei în plasma cîinilor cu autotransplant renal şi a cîinilor cu homotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Fosfataze alcaline (unităţi Bodanski/100 ml)		Aldolaza (unităţi de extincţie)	
		Autotransplant renal	Homotransplant renal	Autotransplant renal	Homotransplant renal
Înainte de transplantarea rinichiului		4,7±0,7	4,7±0,5	29,2±4,6	23,5±3,1
După transplantarea rinichiului (zile)	1—3	10,4±0,5	14,0±1,7	65,0±10,1	69,6± 8,8
	4—6	9,8±0,2	9,9±1,5	65,8±13,7	51,6± 4,8
	7—9	—	9,1±1,9	—	48,6±11,3
	10—13	8,1±0,5	8,1±0,9	51,0± 5,5	44,4± 7,5
	14—16	7,8±0,3	7,8±1,5	46,5± 8,5	36,6± 9,8
	17—20	6,1±0,8	6,2±0,5	39,8± 3,1	33,5± 6,7
	21—24	6,5±0,3	6,4±1,3	38,5± 1,5	27,3± 6,3
	25—28	5,4±0,8	4,4±1,0	33,0± 3,0	21,4± 5,1
	29—32	4,6±0,5	3,8±0,4	33,0± 1,8	22,7± 3,7

* Loturile experimentale au fost constituite din 10 cîini cu autotransplant renal şi 15 cîini cu homotransplant renal (date personale).

genemiei şi o creştere pasageră a timpului de trombină (115). Este interesant de notat că la animalele cu homotransplant hepatic auxiliar se constată, dimpotrivă, o creştere importantă a fibrinogenemiei în primele zile după operaţie, acest fapt fiind în concordanţă cu observaţiile lui Kukral şi colab. (72), potrivit cărora în această fază în ficat sinteza proteinelor este foarte intensă. Nu există

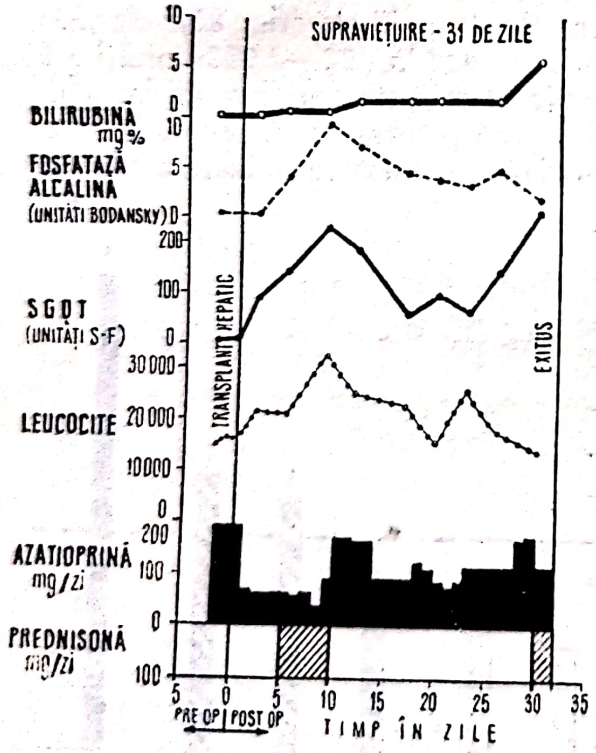


Fig. 80. — Homotransplant hepatic ortotopic la cîine.

A se remarca creşterea activităţii fosfatazelor alcaline şi a SGOT, care pare a se amenda după administrarea prednisonei [după Starzl şi colab. (115)].

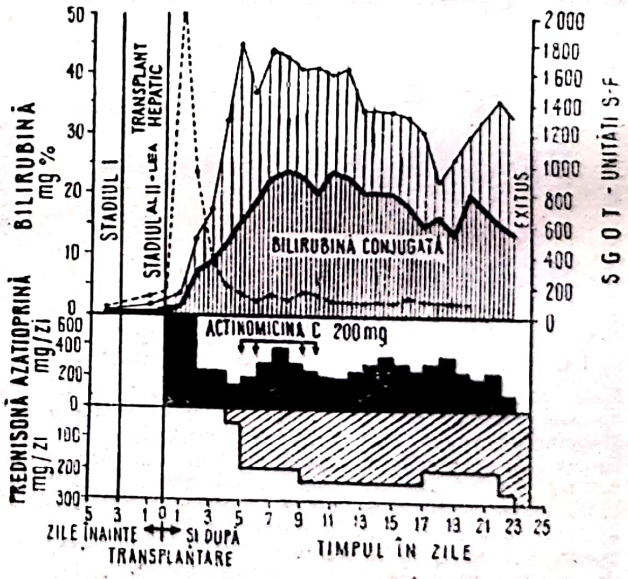


Fig. 81. — Homotransplant hepatic ortotopic la om.

A se nota creşterea precoce a activităţii SGOT şi a bilirubinemiei cu revenirea ulterioară a acestor modificări [după Starzl şi colab. (115)].

Scanned with OKEN Scanner

totdeauna concordanţă între starea clinică a receptorului şi evoluţia acestor indicatori de leziune hepatică (88). Este de asemenea interesant de menţionat că unele dintre modificările biochimice produse de eliminarea ţesutului hepatic sînt produse şi de administrarea azatioprinei. Creşterea activităţii SGPT şi SGOT şi a fosfatazei alcaline în serul cîinilor cu homotransplant hepatic regresează în

Tabelul 35

Variaţiile activităţii SGOT şi a SGPT în plasma cîinilor cu homotransplant renal şi a cîinilor cu autotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		SGOT		SGPT	
		Homotransplant renal	Autotransplant renal	Homotransplant renal	Autotransplant renal
Înainte de transplantarea rinichiului		3,94±0,5	3,93±0,3	4,44±1,1	3,46±0,2
După transplantarea rinichiului (zile)	1— 3	10,82±1,3	8,61±1,8	9,70±1,5	7,93±1,6
	4— 6	8,15±1,0	7,99±0,7	8,39±1,1	7,56±0,7
	7— 9	6,78±1,5	—	7,12±1,5	—
	10—13	6,10±0,8	6,73±0,6	4,91±0,8	5,92±0,7
	14—16	4,38±0,5	6,74±0,6	4,55±0,9	6,09±0,7
	17—20	4,12±0,4	5,10±0,8	3,69±0,4	4,20±0,6
	21—24	3,24±0,4	6,09±0,7	2,85±0,3	5,62±0,7
	25—28	2,96±0,2	5,24±0,7	2,78±0,2	4,68±0,5
	29—32	2,97±0,3	4,68±0,4	3,00±0,2	4,23±0,4

* Loturile experimentale au fost constituite din 15 cîini cu homotransplant renal şi 10 cîini cu autotransplant renal. Rezultatele sînt exprimate pentru ambele enzime în pmol/ml (date personale).

30—40 de zile postoperator. Evoluţia procesului de eliminare, ca şi hepatotoxicitatea substanţelor imunosupresoare nu sînt influenţate de metionină. Rezultatele obţinute în această privinţă de Starzl şi colab. (116) cu l-metionină sau ^{35}S-metionină nu sînt concludente.

Investigaţiile umorale personale au arătat că activitatea SGOT şi SGPT creşte de asemenea în plasma cîinilor cu auto- şi homotransplant renal în primele 20 de zile după operaţie (tabelul 35), fără ca această modificare umorală să aibă un caracter specific.

În cazul homotransplantării rinichiului, activitatea polipeptidazelor din ser creşte în mod considerabil, valorile maxime fiind atinse după 10 zile de la operaţie, adică în momentul în care procesul de eliminare este în plină desfăşurare. Aceste valori se menţin peste 25 de zile, după care revin la normal. O creştere similară a activităţii polipeptidazelor se produce şi la cîinii cu autotransplant renal, dar amploarea acestei modificări este mult mai mică în acest caz (tabelul 36). Activitatea exagerată a polipeptidazelor după homotransplantarea rinichiului se însoţeşte de activarea plasminei, aşa cum reiese din unele cercetări personale nepublicate. Această observaţie este concordantă cu observaţiile altor autori privind evoluţia fibrinogenemiei după transplantarea altor organe (115).

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea ADN-azei în plasma cîinilor cu autotransplant renal şi a acelora cu homotransplant renal nu prezintă variaţii semnificative (tabelul 36).

Activitatea proteolitică intensă în plasmă după transplantarea rinichiului este atestată de asemenea de variaţiile conţinutului său de grupări carboxilice libere, care creşte în perioada postoperatorie de 20—25 de zile, în mod mai evident în cazul cîinilor cu homotransplant renal (tabelul 37).

Tabelul 36

Variaţiile activităţii polipeptidazelor şi a ADN-azei în plasma cîinilor cu homotransplant renal şi a cîinilor cu autotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Polipeptidaze		ADN-ază	
		Homotransplant renal	Autotransplant renal	Homotransplant renal	Autotransplant renal
Înainte de transplantarea rinichiului		$1,5533 \times 10^{-3}$	$0,7500 \times 10^{-3}$	$0,069 \pm 0,007$	$0,084 \pm 0,008$
După transplantarea rinichiului (zile)	1 — 3	$2,9703 \times 10^{-3}$	$0,8740 \times 10^{-3}$	$0,056 \pm 0,009$	—
	4 — 6	$5,4856 \times 10^{-3}$	$1,2514 \times 10^{-3}$	$0,071 \pm 0,00$	$0,076 \pm 0,003$
	7 — 10	$2,1174 \times 10^{-3}$	$0,9514 \times 10^{-3}$	$0,064 \pm 0,014$	—
	11 — 14	$5,3640 \times 10^{-3}$	$1,5137 \times 10^{-3}$	$0,059 \pm 0,006$	$0,039 \pm 0,006$
	15 — 17	$5,8570 \times 10^{-3}$	$1,3786 \times 10^{-3}$	$0,045 \pm 0,012$	$0,032 \pm 0,007$
	18 — 20	$4,1850 \times 10^{-3}$	$1,3143 \times 10^{-3}$	$0,063 \pm 0,007$	$0,089 \pm 0,003$
	21 — 24	$6,8005 \times 10^{-3}$	$1,5490 \times 10^{-3}$	$0,060 \pm 0,012$	$0,090 \pm 0,007$
	25 — 28	$3,4086 \times 10^{-3}$	$1,3100 \times 10^{-3}$	$0,077 \pm 0,019$	$0,099 \pm 0,009$
	29 — 32	$1,2172 \times 10^{-3}$	$0,7100 \times 10^{-3}$	$0,075 \pm 0,012$	$0,083 \pm 0,003$

* Loturile experimentale au fost constituite din 15 cîini cu homotransplant renal şi 10 cîini cu autotransplant renal. Activitatea polipeptidazelor s-a exprimat prin constanta K_1 a formulei:

$$K_1 = \frac{1}{t\ (\text{min.})} \times \log \frac{100}{100 - (\%\ \text{hidroliză})}\ \text{min.}^{-1},$$

pentru t = 30 de minute, iar activitatea ADN-azei în unităţi/ml (date personale).

Tabelul 37

Variaţiile conţinutului de grupări carboxilice libere în plasma cîinilor cu homotransplant renal şi a cîinilor cu autotransplant renal *

Momentul prelevării sîngelui		Autotransplant	Homotransplant
Înainte de transplantarea rinichiului		$0,82 \pm 0,26$	$1,02 \pm 0,16$
După transplantarea rinichiului (zile)	1 — 3	$0,83 \pm 0,13$	$0,51 \pm 0,08$
	4 — 6	$1,01 \pm 0,16$	$1,41 \pm 0,47$
	7 — 10	—	$1,18 \pm 0,23$
	11 — 14	$1,10 \pm 0,27$	$1,24 \pm 0,19$
	15 — 17	$0,99 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,38$
	17 — 20	$1,08 \pm 0,29$	$1,06 \pm 0,23$
	21 — 24	$1,22 \pm 0,26$	$0,85 \pm 0,19$
	25 — 28	$0,54 \pm 0,21$	$1,27 \pm 0,34$
	29 — 32	$0,61 \pm 0,13$	$1,10 \pm 0,29$

* Loturile experimentale au fost constituite din 15 cîini cu homotransplant renal şi 10 cîini cu autotransplant renal. Rezultatele sînt exprimate în ml KOH N/20 (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

După homotransplantarea rinichiului, variațiile nivelului plasmatic al catecolaminelor sînt puțin semnificative și nespecifice (fig. 82). Nivelul plasmatic al cortizolului scade progresiv după transplantarea rinichiului, atingînd nivelul minim în perioada postoperatorie de 9—12 zile. În toată perioada eliminării

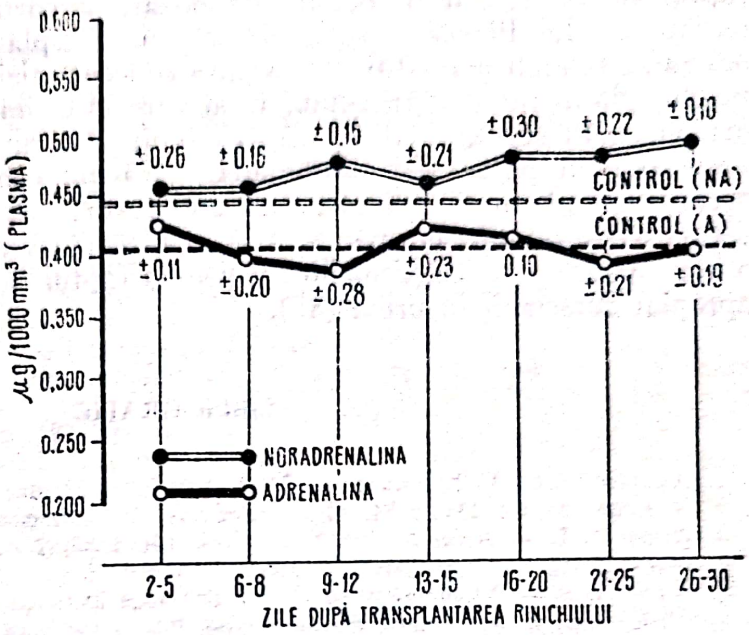


Fig. 82. — Variațiile nivelului plasmatic al catecolaminelor la cîini cu homotransplant renal.

Fiecare cifră reprezintă media rezultatelor a 14 experiențe (date personale).

rinichiului transplantat, nivelul plasmatic al cortizolului se menține la valori joase și revine la valorile de control după 26—30 de zile de la transplantarea organului (fig. 83). Cu toate că, spre deosebire de variațiile nivelului plasmatic

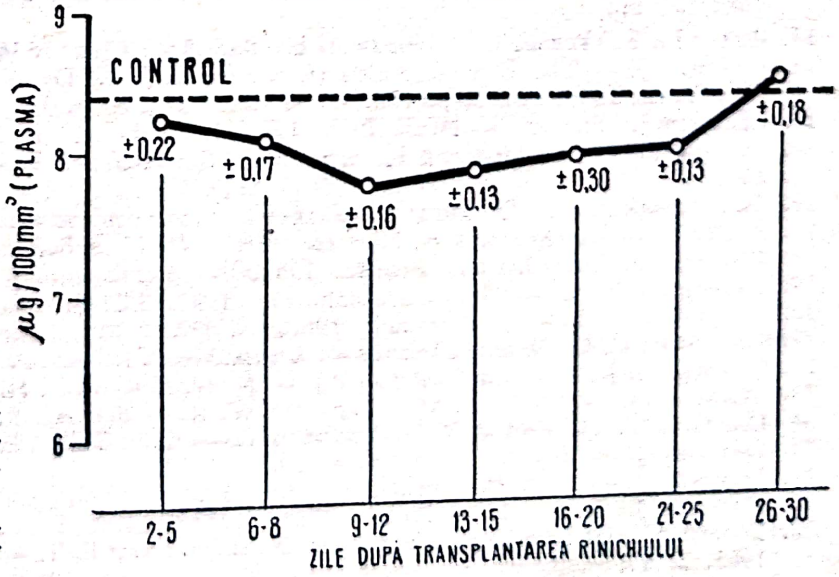


Fig. 83. — Variațiile nivelului plasmatic al cortizolului la cîini cu homotransplant renal.

Fiecare valoare reprezintă media rezultatelor a 14 experiențe (date personale).

Scanned with OKEN Scanner

al catecolaminelor, nivelul plasmatic al cortizolului la cîini cu homotransplant renal evoluează oarecum paralel cu modificările unor parametri semnificativi (concentrația seromucoidului acid α_1, comportamentul electrochimic al plasmei, activitatea dehidrogenazei lactice etc.), interpretarea acestui fapt este dificilă și incertă din cauza limitelor strînse ale variațiilor nivelului său plasmatic. Variațiile cu semnificație nesigură ale acestui parametru s-ar putea explica prin faptul că s-a folosit o metodă de dozare a cortizolului total. După datele recente ale lui Plager și colab. (102), nivelul plasmatic al cortizolului liber, nelegat, este mult mai edificator asupra concentrației tisulare a hormonului decît nivelul plasmatic al cortizolului total care este din punct de vedere fiziologic mai inert. În aceste condiții, scăderii limitate a nivelului plasmatic al cortizolului total ar putea să-i corespundă o scădere comparativ mai importantă a cortizolului plasmatic nelegat, care este forma cea mai activă dintre cele trei forme sub care acest hormon se află în plasmă. Acest parametru ar putea avea o însemnătate practică, deosebită și pentru faptul că are un corespondent foarte apropiat detectabil în urină (89).

BIBLIOGRAFIE

1. Abeyounis C. J., Milgram F., Vitebsky E. — *Nature (Lond.)*, 1964, *203*, 313.
2. Allfrey V. G., Daly M. M., Mirsky A. E. — *J. gen. Physiol.*, 1953, *37*, 157.
3. Amos D. B. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 273.
4. Amos D. B. — *Progr. Allergy*, 1962, *6*, 468.
5. Amos D. B. — Mechanism of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions (P. Grabar, P. Miescher), Ed. Schwabe, Basel, 1962, p. 210.
6. Baker P. J., Weiser R. S., Jutila J. W., Evans C. A., Blandan R. J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *101*, 46.
7. Barkan P., Silver M. J. — *Progr. Hemat.*, 1962, *3*, 170.
8. Beck W. S. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *75*, 4.
9. Beck W. S., Valentine W. N. — *J. Lab. clin. Med.*, 1951, *38*, 245.
10. Beck W. S., Valentine W. N. — *Cancer Res.*, 1952, *12*, 818.
11. Beck W. S., Valentine W. N. — *Cancer Res.*, 1952, *12*, 823.
12. Bernfeld P. — Biogenesis of Natural Compounds. Ed. Pergamon Press, New York, 1963, p. 339.
13. Borst P., Slater E. C. — *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 1961, *48*, 362.
14. Brachet J. — The Nucleic Acids (E. Chargaff, J. N. Davidson), Ed. Academic Press, New York, 1955, vol. 2, p. 476.
15. Brachet J., Ficq A. — *Arch. Biol.*, 1956, *67*, 431.
16. Braunsteiner H., Dienstl F., Sailer S., Sandhoffer F. — *Acta Haemat.*, 1963, *30*, 334.
17. Braunsteiner H., Dienstl F., Sailer S., Sandhoffer F. — *Blood*, 1964, *24*, 607.
18. Brent L. — Mechanisms of Hypersensitivity (J. H. Schaffer, G. A. LoGrippo, M. W. Chase), Ed. Little-Brown, Boston, 1959.
19. Casperson T. O. — *Naturwissenschaften*, 1941, *28*, 33.
20. Christian C. L. — *J. Immunol.*, 1960, *84*, 112.
21. Cochrane C. G., Weigle W. O. — *J. exp. Med.*, 1958, *108*, 591.
22. Colombani J., Dausset J., Préaux J. — *Nouv. Rev. franç. Hemat.*, 1963, *3*, 499.
23. Cosimi A. B., Reckler J. M., Waddell W. R. — *J. Surg. Res.*, 1965, *5*, 346.
24. Danaher T. H., Friou G. J., Finch S. C. — *Clin. Res.*, 1957, *5*, 9.
25. Dausset J. — *Vox Sang.*, 1954, *4*, 190.
26. Dausset J. — *Acta Haemat.*, 1958, *20*, 156.
27. Dausset J., Brecy H. — *Nature (Lond.)*, 1957, *180*, 1 430.
28. Dausset J., Colombani J., Feingold N., Rapaport F. T. — *Nouv. Rev. franç. Hemat.*, 1965, *5*, 17.

Scanned with OKEN Scanner

29. Dausset J., Rapaport F. T., Colombani J., Feingold N. — *Transplantation*, 1965, 3, 701.
30. Davies A. J. S., Doak S. — *Nature (Lond.)*, 1960, *187*, 610.
31. Delanuay A., Pages J., Maurice M. — *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1946, *72*, 946.
32. Dempster W. J. — *Brit. J. Surg.*, 1953, *40*, 447.
33. Dioguardi N., Agostoni A., Fiorelli G., Lomanto B. — *J. Lab. clin. Med.*, 1963, *61*, 713.
34. Dunea G., Nakamoto S., Straffon R. A., Kolff W. J. — *Arch. intern. Med.*, 1965, *116*, 234.
35. Fallon H.J ., Frei E., Davidson J. D., Trier J. S., Burk D. — *J. Lab. clin. Med.*, 1962, *59*, 779.
36. Ficq A., Brachet J. — *J. exp. Cell Res.*, 1956, *11*, 135.
37. Fisher E. R., Fisher B. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1959, *101*, 259.
38. Fisher B., Fisher E. R., Lee S., Sakai A. — *Transplantation*, 1965, *3*, 49.
39. Fisher B., Lee S. H., Fisher E. R. — *Surgery*, 1963, *54*, 784.
40. Forbes J. J., Makaness G. B. — *Lancet*, 1963, *2*, 1 203.
41. Forster R. P., Cross R. J., Taggart J. V. — Methods in Medical Research (A. C. Corcoran), Ed. Year Book Publ., Chicago, 1952, vol. 5, p. 231.
42. Friedman E. A., Retan J. W., Marshall D. C., Henry L., Merrill L. P. — *J. cn.il Invest.*, 1961, *40*, 2 162.
43. Gaudino M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, *59*, 361.
44. Gombos A., Tischler V., Jacina J., Skokan J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 787.
45. Gorer P. A. — *J. Path. Bact.*, 1937, *44*, 691.
46. Gorer P. A. — *Advanc. Cancer Res.*, 1956, *4*, 249.
47. Gorer P. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 707.
48. Gorer P. A. — *Advanc. Immunol.*, 1961, *1*, 345.
49. Gorer P. A., Kallis N. — *Cancer Res.*, 1959, *19*, 824.
50. Granger G. A., Weiser R. S. — *Science*, 1964, *145*, 1 427.
51. Gräsbeck R., Nordman C., Chapell A. de la — *Lancet*, 1963, *2*, 385.
52. Hamburger J., Vaysse J., Crosnier J., Auvert J., Dormont J. — *Bull. Soc. med. Hôp. (Paris)*, 1963, *114*, 225.
53. Hardin C. A., Werder A. A., Morgan P. — *Surg. Gynec. Obstet.*, 1958, *106*, 605.
54. Hardin E. B., Valentine W. N., Folette J. A., Lawrence J. S. — *Amer. J. med. Sci.*, 1955, *229*, 397.
55. Hartman J. D , Hoch W. S. — *Amer. J. Physiol.*, 1955, *183*, 214.
56. Haurowitz F. M. — Proceedings of the 3rd International Congress of Biochemistry, Brussels, 1955, p. 104.
57. Hirschhorn K., Bach F., Kolodny R. L., Firschein I. L., Hashem N. — *Science*, 1963, *142*, 1 185.
58. Horowitz R. E., Burrows L., Paronetto F., Dreiling D., Kark A. E. — *Transplantation*, 1965, *3*, 318.
59. Hubay C. A., Persk L., Vasko K., Holden W. D. — *Invest. Urol.*, 1963, *1*, 56.
60. Hume D. M., Mages J. H., Prout G. R., Kauffman H. M., Cleveland R. H., Bower J. D., Lee H. M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 578.
61. Izak G., Vries A. de — *J. Lab. clin. Med.*, 1960, *55*, 564.
62. Janigan D. T., Williams M. A., Tyler H. M., Dempster W. J. — *Brit. J. exp. Path.*, 1964, *45*, 347.
63. Jeejeebhoy H. F. — *Transplantation*, 1965, *3*, 257.
64. Jochims J. — *Klin. Wschr.*, 1962, *40*, 520.
65. Judah J. D. — *Biochem. J.*, 1951, *49*, 271.
66. Kabat E. A., Mayer M. M. — Experimental Immunochemistry, Ed. Thomas, Springfield, 1961, p. 785.
67. Kalliss N. — *Cancer Res.*, 1958, *18*, 992.
68. Knake E. — Biological Problems of Grafting (F. Albert, P. B. Medawar), Ed. Blackwell, Oxford, 1959, p. 341.
69. Kolker P., Mandell C., Lear P. E. — *Surg. Forum*, 1965, *16*, 252.
70. Kopp W. L. — *J. Lab. clin. Med.*, 1963, *62*, 18.
71 Krebs H. S., Löwenstein J. M. — Metabolic Pathways (D. M. Greenberg), Ed. Academic Press, New York, 1960, vol. 1, p. 176.

Scanned with OKEN Scanner

116. Starzl T. E., Marchioro T. L., Porter K. A., Taylor P. D., Faris T. D., Herrman T. J., Hlad C. J., Waddell W. R. — *Surgery*, 1965, *58*. 131.
117. Straub F. B. — *Enzymologia*, 1940, *9*, 143.
118. Teply J. L. — *J. biol. Chem.*, 1949, *174*, 383.
119. Tong J. L., Boone D., Badgett B. — *Science*, 1965, *149*, 753.
120. Tyler H. M., Williams M. A., Demspter W. J. — *Nature (Lond.)*, 1964, *201*, 84.
121. Van Rood J. J., Kernisse J. G., Van Leeuwen A., — *Nature (Lond.)* 1958, *181*, 1 735.
122. Van Rood J. J., Van Leeuwen A. — *J. clin. Invest.*, 1963, *42*, 1 382.
123. Van Rood J. J., Van Leeuwen A., Bosch L. J. — Proceedings of the 8th Congress of the European Hematological Society, Ed. Karger, Basel, 1962.
124. Veith F. J., Stenzel K. H., Thompson D. D., Karl R. C., Rubin A. L. — *Surg. Forum*, 1965, *16*, 263.
125. Vesell E. S., Bearn A. G. — *J. clin. Invest.*, 1961, *40*, 586.
126. Voisin G. A., Maurer P. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *64*, 1 053.
127. Wacker W. E. C., Dorfman L. E. — *J. Amer. med. Ass.*, 1962, *181*, 972.
128. Waksman B. H., Matoltsy M. — *J. Immunol.*, 1958, *81*, 220.
129. Weiser R. S., Granger G. A., Brown W., Baker P., Jutila J., Holmes B. — *Transplantation*, 1964, *3*, 10.
130. Werder A. A., Hardin C. A., Morgan P. — *Fed. Proc.*, 1957, *16*, 376.
131. West C. D., Fowler R. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *87*, 522.
132. Williams M. A., Morton M., Tyler H. M., Dempster W. J. — *Brit. J. exp. Path.*, 1964, *45*, 235.
133. Williams M. A., Tyler H. M., Morton M., Nemeth A., Dempster W. J. — *Brit. med. J.*, 1962, *2*, 1 215.
134. Wilson D. B. — *J. exp. Med.*, 1965, *122*, 143.
135. Wilson R. E., Clarke S. D., Crosby D. L. — *Surg. Forum*, 1963, *14*, 156.
136. Woodruff M. F. A. — *Ann. roy. Coll. Surg. Engl.*, 1952, *11*, 173.
137. Wright E. S., MacPhee I. W. — *Surg. Gynec. Obstet.*, 1965, *121*, 1 052.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL al VI-lea

IMUNOTOLERANȚA

Suprimarea răspunsului imun al receptorului de homo- sau heterografe a suscitat interesul a foarte numeroși cercetători. Dovezile experimentale și clinice în acest domeniu sînt numeroase. Cu toate acestea, pînă acum, cercetările teoretice nu s-au concretizat în formule practice foarte eficace, această situație justificînd eforturile care se fac astăzi atît în ceea ce privește obținerea unei imunotoleranțe biologice active, cît și în ceeea ce privește inducerea sa pe căi artificiale.

A. IMUNOTOLERANȚA BIOLOGICĂ ACTIVĂ

Persistența unei grefe omologe în organismul receptor este condiționată de intensitatea reacției imunologice care se declanșează în acest organism. Cu cît această reacție este mai intensă și mai precoce, cu atît timpul de supraviețuire a țesutului transplantat este mai scurt. Persistența mai îndelungată sau mai puțin îndelungată a grefei depinde deci, practic, de posibilitățile de a atenua sau a anula reacția imunologică a organismului receptor de a o elimina. Anularea reacției imunologice a gazdei față de antigenele de transplantare aduse de grefă permite crearea stadiului de toleranță indefinită a grefei în organismul receptor.

Prin toleranță imunologică dobîndită activ se înțelege starea în care o gazdă competentă imunologic nu mai inactivează antigenul specific primit. Fenomenul constă dintr-o inhibare centrală a facultății de răspuns imunologic, indusă prin antigene celulare. Aceste antigene pot avea forma celulelor vii, intacte, a celulelor distruse, a extractelor celulare semisolubile sau a produselor celulare solubile, obținute prin diferite procedee chimice.

Pentru realizarea acestei stări s-au încercat diferite metode de condiționare specifică. Teoretic, suprimarea reacției receptor-grefă se poate obține pe două căi: fie prin condiționarea specifică a receptorului pentru a nu mai elabora anticorpi față de antigenul de transplantare, fie prin condiționarea specifică a grefei, micșorîndu-i antigenicitatea și, deci, punînd-o în condiția de a nu mai declanșa răspunsul imun din partea gazdei.

S-a încercat realizarea ambelor situații biologice prin diferite metode, obținîndu-se unele rezultate încurajatoare.

Scanned with OKEN Scanner

Primul autor care a semnalat existența unei imunotoleranțe, dobîndită activ, a fost Owen (686), în 1945. El a remarcat că gemenii de bovidee sînt purtători adesea ai ambelor tipuri de eritrocite particulare fiecărui făt în parte. Faptul a fost interpretat ca o consecință a unui eventual transfer de elemente eritropoietice prin anastomozele placentare. Celulele transferate, diferite genetic de tipul eritrocitar dominant al fiecărui făt (receptor), nu sînt eliminate, ci persistă permanent, chiar în perioada vîrstei adulte, realizînd o adevărată stare de himerism celular permanent în animalul respectiv.

Acest fapt poate fi corelat cu observațiile lui Burnett și Fenner (131). Acești autori au subliniat că între țesuturile aceluiași organism există o lipsă de reactivitate, care sugerează că în timpul vieții embrionare, țesuturile „învață să se recunoască" unul pe celălalt ca aparținînd aceluiași individ. Mai tîrziu, în timpul maturității, apariția unor noi țesuturi în organism poate face ca acestea să funcționeze ca antigene și să dea naștere la autoanticorpi.

Ipoteza firească pe care au determinat-o aceste observații a fost că în timpul vieții embrionare, organismul ar avea o perioadă de imaturitate imunologică totală, urmată de o perioadă de maturizare imunologică și, apoi, de competența imunologică caracteristică vîrstei adulte. În mare, această ipoteză, deși parțial revizuită, s-a dovedit a fi relativ exactă. Pe baza ei, în 1953, Billingham și colab. (74) au reușit să inducă experimental o toleranță specifică față de țesuturi omologe prin inocularea unei suspensii celulare provenind de la șoareci dintr-o anumită linie genetică la embrionii de șoareci aparținînd altei linii genetice, diferită de prima. Inocularea suspensiilor celulare s-a făcut prin peretele abdominal în uterul animalelor gestante. Embrionii astfel injectați, deveniți adulți, s-au dovedit a fi perfect toleranți față de grefa de piele de la șoareci din linia genetică a donatorilor de suspensie celulară și intoleranți față de orice grefă de altă proveniență. Cu această experiență, calea practică de inducere a toleranței dobîndite activ a fost deschisă; în anii care au urmat s-au încercat nenumărate metode și modele experimentale pentru inducerea toleranței față de grefe și s-au formulat numeroase ipoteze pentru explicarea mecanismului acestui tip de imunotoleranță.

Considerăm că, pentru înțelegerea datelor care urmează a fi prezentate, este util să se reamintească elementele esențiale ale mecanismelor imunologice responsabile de eliminarea grefei, deoarece prin blocarea acestor mecanisme la diferite niveluri, gazda devine incapabilă de a elimina grefa și, deci, tolerantă față de țesutul transplantat.

În capitolul al III-lea s-a arătat că după pătrunderea antigenului în organism, în cursul așa-numitei fază aferentă, antigenul este transportat și pus în contact cu centrele imune ale receptorului. S-a dovedit experimental că faza aferentă este mai complexă decît s-a presupus inițial. Astfel, Fishman (275) a demonstrat că antigenul este mai întîi „preparat" cu ajutorul macrofagelor, în sensul de a incita răspunsul mecanismului central. Orice procedeu care interferează funcția sistemului macrofagelor poate interfera, implicit, faza aferentă a răspunsului imun. În această fază a răspunsului imun pot să apară deficiențe imunologice, dacă antigenul este sechestrat în afara centrilor imuni sau dacă este făcut de nerecunoscut ca antigen de către acești centri. Faza următoare cuprinde reacțiile proprii ale centrilor imuni. Ele sînt complexe și insuficient cunoscute și explicate pînă astăzi; antigenul este recepționat și sortat în funcție

Scanned with OKEN Scanner

de specificitatea sa, iar anticorpii se produc ca un răspuns la un stimul antigenic specific. În această fază se poate interveni prin diminuarea sau abolirea capacității acestor centri de a reacționa. Practic s-au folosit în acest scop mai multe căi: de exemplu, celulele producătoare de anticorpi au fost îndepărtate și distruse sau, dimpotrivă, centrii imuni au fost „adaptați" la un antigen specific prin inhibarea adecvată a capacității lor de a sintetiza anticorpii respectivi. În faza următoare, faza eferentă, anticorpii specifici se unesc cu antigenul și îl neutralizează, formînd complexele antigen-anticorp. Faza eferentă poate fi blocată prin distrugerea, alterarea, inactivarea sau limitarea funcțională a anticorpilor înainte de a se uni cu antigenul. În experiențele lui Billingham și colab. (74), citate mai sus, toleranța la animalele nou-născute s-a obținut prin acțiune asupra mecanismului central și nu prin interferența fazei aferente sau eferente. Acest fapt a fost demonstrat tot de Billingham și colab. (75), care au abrogat stadiul de imunotoleranță prin injectare de celule limfatice izologe (de aceeași linie genetică) la animalele tolerante, aplicînd astfel principiul „imunizării prin adopțiune" (626, 627) și au demonstrat că elementele aferente și eferente ale reacției imune au rămas intacte în experiențele lor.

Inducerea imunotoleranței se reduce, deci, la modificarea sau, mai exact, la abolirea reacției față de homografă, dar din păcate nu se poate afirma că acest lucru ar fi posibil practic, fie modificînd proprietățile antigenice ale celulelor grefei, fie modificînd competența imunologică a gazdei. În cele ce urmează se prezintă date privind numai ultima ipoteză, deoarece pînă acum nu s-a găsit nici o posibilitate de a interveni practic prin declanșarea unui proces de „dezindividualizare" a grefei înainte de a o transplanta, fără ca, în același timp, să nu se distrugă celulele ei constituente. Abordarea indirectă a acestui aspect s-a realizat prin încercările de selecționare a donatorilor de grefă în sensul de a fi cît mai apropiați genetic și, deci, antigenic de viitorul receptor.

Așadar, mijloacele actuale de inducere a toleranței specifice față de țesuturile transplantate se adresează în primul rînd receptorului și urmăresc limitarea capacității sale de reacție imunologică specifică. Se știe că animalele carențate, intoxicate sau bolnave, sînt mai receptive pentru transplante diverse decît animalele normale, iar metodele terapeutice folosite pentru scăderea răspunsului imun (iradierea cu raze Röntgen, administrarea de hormoni steroizi sau de substanțe imunosupresoare și citostatice) realizează stări similare (893).

O serie de date interesante asupra mecanismului de eliminare și a stării de imunotoleranță au fost aduse de studiile efectuate pe grefele de tumori. În general, grefele de țesuturi normale și grefele de țesuturi tumorale sînt supuse acelorași legi genetice, de la care însă grefele tumorale se pot sustrage uneori. Astfel, o tumoare poate avea o creștere atît de rapidă, încît să omoare gazda, nu pentru că aceasta nu a reacționat imunologic, ci pentru că reacția sa a fost învinsă. Legile genetice ale transplantării de tumori sînt mai simple decît acelea ale transplantării țesutului normal. Formarea de antigene suficient de puternice pentru a induce reacții imunologice capabile să reducă energia de creștere a tumorii pare a fi limitată în țesutul tumoral (825). Antigene minore pot interveni în acest caz printr-o reacție inflamatoare, sau oarecare întîrziere în dezvoltarea liberă a tumorii, dar sînt insuficiente pentru a determina regresiunea ei. Acest fenomen nu apare în cazul grefei de piele, cînd chiar antigenele minore sînt suficiente pentru declanșarea unei reacții imunologice care provoacă elimi-

Scanned with OKEN Scanner

narea grefei. Dacă o tumoare transplantată la şoarece are unul sau două antigene majore care lipsesc la gazdă, de obicei, această tumoare se dezvoltă un timp şi apoi regresează. Dacă gazda este condiţionată în prealabil, scăzîndu-i-se rezistenţa, tumoarea se dezvoltă şi ajunge să omoare gazda. Această condiţionare se poate realiza în diferite moduri, iar lucrările experimentale din ultimii ani au realizat o serie de aspecte practice (451, 452, 824), prin injectarea, înainte de grefarea tumorii, a unor ţesuturi devitalizate sau extracte tisulare care dau o imunizare activă. Se obţine astfel o mărire a potenţialului grefei tumorale care favorizează prinderea ei, fenomen cunoscut sub numele de potenţare sau facilitare (*enhancement*). Fenomenul de facilitare se datoreşte, deci, unei imunizări active. Kallis (451, 452) a arătat că există o legătură directă între titrul mare de anticorpi circulanţi şi supravieţuirea grefei de tumoare; în acest caz paradoxul fiind de fapt numai aparent, deoarece preparatul tisular folosit pentru a produce facilitarea nu poate provoca şi imunitatea de transplantare. Acest antigen formează anticorpii serici care nu au un rol direct sau preponderent în eliminarea homotransplantului (325).

Legătura exactă între anticorpi şi facilitare nu este însă elucidată. O posibilitate ar fi ca facilitarea să fie de fapt un proces de desensibilizare, ipoteză emisă de Billingham şi colab. (78).

În principiu, importanţa clinică a fenomenului de facilitare este foarte mare. Acest fenomen ar putea constitui premisa pentru realizarea unui tratament eficace în vederea dobîndirii toleranţei faţă de grefe, care ar putea fi folosit la animalele adulte cu atît mai mult, cu cît el nu apare numai în cazul grefelor de ţesuturi tumorale. Din păcate, însă, la grefele de ţesut normal (experienţele s-au făcut cu grefe de piele), perioada de supravieţuire obţinută prin tratarea prealabilă a gazdei cu injecţii de ţesuturi îngheţate şi uscate a fost numai de 2—3 ori mai mare decît la animalele netratate (78). Billingham şi Sparrow (89) au arătat că injectarea intravenoasă a cîtorva milioane de celule epidermice disociate poate atenua mult reacţia de eliminare a grefei de piele la iepuri. Fenomenul pare a fi condiţionat însă de reacţia proprie a acestei specii de animale la această cale de administrare, dat fiind că nu s-a putut reproduce la şoareci sau cobai şi, deci, nu poate fi încadrat într-un fenomen tipic de facilitare.

1. UNELE ASPECTE TEORETICE ALE INDUCERII IMUNOTOLERANŢEI

a) **Producerea anticorpilor.** În ultimă instanţă, un animal tolerant la o grefă străină este un animal care nu reacţionează prin producere de anticorpi la stimulii antigenici ai ţesutului grefat.

S-a încercat explicarea mecanismului de producere a anticorpilor şi, implicit, a inducerii imunotoleranţei, prin diferite teorii, dintre care cîteva s-au dovedit a avea o corespondenţă în realitate.

Anticorpii fiind proteine de tip globulinic, este clar că orice teorie asupra formării anticorpilor trebuie să fie conformă cu cunoştinţele noastre actuale asupra mecanismului biosintezei de proteine şi, în special, a biosintezei γ-globulinelor. Se ştie astăzi că în biosinteza proteinelor pot fi incluse mai multe

Scanned with OKEN Scanner

trepte: activarea aminoacizilor de către ATP şi formarea de esteri ai aminoacizilor cu ARN-*s* cu ajutorul unor enzime specifice fiecărui aminoacid; depunerea resturilor aminoacide pe ribozomi într-o anumită secvenţă, care este definită ca ARN de informaţie sau ARN-*m*; formarea unor lanţuri de peptide legate de ribozomi şi eliberarea resturilor de ARN-*s*. Cum moleculele de anticorpi de tip 7S constau din două lanţuri polipeptidice B şi două lanţuri polipeptidice A, ultima treaptă în biosinteza lor este probabil combinarea acestor patru lanţuri pentru a forma o moleculă de tip A2B2 şi secreţia consecutivă în plasma sanguină a anticorpilor formaţi în celulă. În acest proces pot interveni şi alte reacţii. Astfel, anticorpii de tip 19S diferă de cei de tip 7S nu numai prin dimensiunea lor mai mare, dar şi prin comportamentul lor faţă de compuşii sulfhidrilici. Pe de altă parte, la unele specii animale, majoritatea anticorpilor rămîn cantonaţi intracelular, în timp ce la altele, ei sînt eliminaţi în curentul plasmatic sanguin. Pentru a forma anticorpi, antigenul trebuie să pătrundă în celulă şi să fie degradat; fragmentele sale trebuie apoi să fie legate de celulă. Lipsa de antigenicitate a unor poli-*d*-aminoacizi se explică tocmai prin lipsa unor enzime care să degradeze aceşti polimeri (519). Cum majoritatea celulelor formatoare de anticorpi dau naştere unui singur tip de anticorpi (30, 552), chiar după imunizarea cu două sau mai multe antigene, Szillard (869) a arătat că un represor închide celulele după pătrunderea primului antigen şi că acesta le face insensibile la alte molecule antigenice. Principala chestiune la care orice teorie satisfăcătoare asupra formării anticorpilor trebuie să dea răspuns se referă la faza biosintezei de γ-globuline în care trebuie să intervină antigenul pentru a transforma biosinteza de γ-globulină în biosinteză de anticorp specific.

La această întrebare s-au dat mai multe răspunsuri, care sînt schematizate în figura 84. Din această figură reiese că după ce aminoacizii liberi sînt activaţi de către ATP, iar o enzimă specifică fiecăruia catalizează combinaţia restului aminoacil cu ARN-*s*, transferul restului de aminoacili pe ribozom este realizat de ARN-*m*, a cărui secvenţă nucleotidică este complementară ADN din orice celulă limfoidă competentă imunologic. Acest transfer are loc pe baza templatului sau ADN din celulele limfatice competente selectiv, predestinate să formeze tipul respectiv de anticorpi, care se combină specific cu grupul determinant al antigenului administrat. Asupra mecanismului de acţiune a antigenului s-au emis multiple teorii. Astfel, litera (*a*) din figura 84 cuprinde teoriile care susţin selecţia de către antigene a acelor celule limfatice competente imunologic, adică celulele care prin aparatul lor genetic sînt predeterminate să producă anticorpi omologi. Prima dintre aceste teorii a fost susţinută de Ehrlich (237), care a presupus existenţa unor zone de combinare preformate, denumite „receptori", cu selectivitate pentru fiecare dintre nenumăratele antigene posibile. Jerne (439) a modificat acest punct de vedere în „teoria selecţiei naturale", adăugînd observaţia că celulele care, după Ehrlich, ar avea receptori omologi, produc continuu cantităţi mici din anticorpul respectiv, astfel încît urme din fiecare anticorp posibil se pot întîlni în circulaţia sanguină. Această ipoteză a fost acceptată ca bază de pornire de către Burnett (131), care a renunţat astfel la punctul său de vedere anterior asupra producerii unor enzime adaptative [punctul (*d*) din figura 84] şi a atribuit intensitatea răspunsului imun secundar unei stimulări specifice a multiplicării celulelor formatoare de

Scanned with OKEN Scanner

Schema diferitelor faze în biosinteza anticorpilor *

Factori incriminaţi în biosinteză	Fazele de biosinteză a proteinelor	Acţiunea antigenului (după diferite teorii)
ATP	Activatorul de aminoacizi	
	↓	
ARN-s+enzime	Aminoacil — AMP	
	↓	
Sintetaza ARN-m ARN ribozomal	Aminoacil — ARN-s	a) Selecţie celulară b) Selecţie subcelulară c) Mutaţie d) Producerea unor enzime adaptative e) Modificări în secvenţa aminoacizilor
	↓	
Conformaţie determinată de structura primară (?) sau de template normale (?) Factori pentru combinarea lanţurilor A şi B (?)	Peptide legate de ribozomi	f) Direcţia de replicare şi de combinare a lanţurilor A şi B g) Acţiunea templatului în timpul oxidării (-SH) în (-S-S-) h) Selecţionarea moleculelor complementare de γ-globuline
	↓	
Enzime de eliberare	Anticorpi intracelulari	i) Represiune (?)
	↓	
	Anticorpi în fluidele organismului	

* După Haurowitz (386).

Fig. 84.

anticorpi, preadaptate. Cum multiplicarea celulelor somatice are loc în special prin diviziune, populaţia acestor celule formează un clon. Teoria lui Burnett (127, 128) s-a numit „teoria selecţiei clonale a imunităţii dobîndite". Principala obiecţie care se ridică împotriva oricărui tip de selecţie celulară se bazează pe existenţa unui mare număr de substanţe sintetice, determinante antigenic, care, deşi nu se întîlnesc în natură, sînt totuşi capabile să inducă producerea de anticorpi specifici. În plus, este extrem de greu de admis că organismul unui animal aşa de mic, cum este şoarecele, poate avea un număr suficient de diferite tipuri de celule, fiecare dintre ele predestinate să formeze un anticorp faţă de fiecare dintre numeroasele antigene naturale şi sintetice, menţionate în alt capitol.

Pe de altă parte, Šterzl (853) a arătat că un număr mare de celule, dacă nu chiar majoritatea celulelor limfatice ale unui iepure sensibilizat, încep să formeze anticorpi după injectarea altui antigen. De asemenea, celule limfatice izolate de la iepuri sau şobolani injectaţi cu un amestec de două antigene diferite sînt capabile să producă ambele tipuri de anticorpi, deşi regula este ca fiecare celulă să fabrice numai un singur tip de anticorpi (30, 671, 672, 869). Împotriva „teoriei selecţiei naturale" s-au mai ridicat şi alte obiecţii, ca heterogenicitatea anticorpilor în cursul răspunsului la acelaşi antigen (28) sau absenţa

Scanned with OKEN Scanner

unor clone bine definite de celule formatoare de anticorpi (948). Teoria selecției clonale nu a mai putut fi susținută, cînd Trentin (898) a demonstrat că un clon pur de celule poate forma anticorpi față de patru antigene diferite, ceea ce a făcut, potrivit expresiei lui Burnett (129), „să explodeze teoria selecției clonale originale".

Jerne (440) și Burnett (129) admit în prezent existența unei selecții a unităților sau receptorilor subcelulari (punctul *b* din figura 84). Din acest punct de vedere, selecția ar avea loc la nivelul ribozomilor din orice celulă competentă (440, 868, 869); cum numărul ribozomilor dintr-o celulă este foarte mare, este explicabilă posibilitatea unei celule de a fabrica un număr mare de anticorpi diferiți.

Rolul selectiv al antigenului poate interveni de fapt și în etapele ulterioare ale biosintezei de anticorpi. Astfel, Boyden (96) presupune că lanțurile de γ-globuline nou-formate, cu configurație foarte diferită, sînt distruse rapid și că rolul moleculei de antigen este de a sustrage lanțurile de γ-globuline care au afinitate față de ea, protejîndu-le de distrugere. O ipoteză similară este susținută și de Günther (345). S-a emis de asemenea ipoteza că antigenul poate provoca mutații (127, 131).

Ceea ce se poate afirma cu siguranță este că moleculele de antigen interferează biosinteza de proteine (672, 837). O problemă nerezolvată este aceea a modului de acțiune a antigenului. Nu se știe încă dacă antigenul acționează primar pe acizii nucleici ai aparatului genetic, dacă intervine în fazele ulterioare ale biosintezei de anticorpi sau dacă intervine în două sau mai multe trepte. Intervenția antigenului în fazele (*e*) și (*f*) de formare a lanțurilor peptidice (fig. 84) a fost postulată de Breinl și Haurowitz (99) în teoria privind rolul templatului în sinteza anticorpilor, reluată de Mudd (636), Alexander (10) și Pauling (692), care, acceptînd rolul de templat al antigenului, au presupus că potrivirea strînsă dintre antigene și anticorpi se realizează prin replicarea unei molecule normale de γ-globulină în prezența unui antigen și că acest proces nu implică diferențe în compoziția și secvența aminoacizilor în moleculele de anticorpi față de γ-globulinele normale. Ipoteza sa a fost acceptată și de alți autori (384, 458, 459), fiind foarte atractivă prin simplitatea ei, dar a fost infirmată prin descoperirea faptului că doi anticorpi formați simultan într-un singur animal pot avea conținut și aranjament diferit de aminoacizi (486) și prin observația că serul anti-ASB de iepure, nereplicat și denaturat, se replică din nou și-și recapătă activitatea de anticorp după îndepărtarea agentului denaturant (121).

Unii autori (29, 346, 402, 427) au socotit că anticorpii s-ar forma din γ-globuline și că ei înlocuiesc γ-globulinele în organismele imunizate, ceea ce ar însemna că formarea de anticorpi nu este altceva decît o modificare a procesului normal de biosinteză a γ-globulinelor.

În legătură cu mecanismul de eliberare a anticorpilor în circulație se cunosc foarte puține fapte; nu se știe nici dacă procesul include sau nu acțiunea vreunei enzime. Jerne (440) a invocat intervenția unei astfel de enzime, probabil o hidrolază, care în stadiul de toleranță imunologică ar fi inactivată de un represor, prevenind în acest mod eliberarea anticorpilor în circulație.

Scanned with OKEN Scanner

b) **Mecanismul inducerii imunotoleranței active.** S-a amintit la începutul acestui capitol că se poate induce toleranța față de anumite antigene (grefe de țesuturi sau organe) prin administrarea lor la animalele nou-născute sau embrioni, adică în perioada în care ele nu reacționează imunologic. Această lipsă de răspuns imunologic al embrionilor și animalelor nou-născute a fost atribuită incapacității lor de a produce γ-globuline; animalul nou-născut se comportă în mod evident ca un animal adult, la care capacitatea de a fabrica anticorpi a fost suprimată prin expunere la raze Röntgen sau prin administrare de azotiperită. Pe baza teoriilor de producere a anticorpilor s-au emis mai multe ipoteze, pentru a explica apariția imunotoleranței active.

Burnett (130) a explicat starea de toleranță imunologică pe baza teoriei selecției clonale și a atribuit-o eliminării acelor clone care au fost predestinate să formeze anticorpi la antigenul injectat. Alterarea celulelor respective la animalul nou-născut, prin injectarea antigenului omolog, ar proveni din diferențierea lor ulterioară în celule formatoare de anticorpi și ar face astfel imposibilă producerea anticorpilor omologi; formarea anticorpilor față de alte antigene de către alte celule nu ar fi afectată. Acest punct de vedere a fost însă părăsit cînd Smith și Bridges (823) au demonstrat că imunotoleranța nu durează indefinit, ci este un fenomen finit, a cărui durată crește proporțional cu cantitatea de antigen administrată. Fulton și colab. (289, 290) au demonstrat că șoarecii adulți injectați cu 0,5 mg de polizaharid pneumococic de tip III sînt ulterior incapabili de a forma anticorpi față de această substanță. Ei au arătat de asemenea că antigenul persistă în animal timp de mai multe luni și au atribuit persistența sa lipsei din organismul animalului a unei enzime capabile să-l degradeze. Această areactivitate imunologică a șoarecelui a fost considerată ca o „paralizie imunologică". Toleranța imunologică dobîndită apare în multe privințe evocatoare a paraliziei imunologice. Analogia dintre cele două fenomene este subliniată și de observația potrivit căreia toleranța față de ASB apare nu numai la animalele nou-născute, ci și la iepurii adulți, la care se administrează cantități mari de ASB. În ambele tipuri de toleranță, incapacitatea de a forma anticorpi se remite în mod gradat: stadiul de lipsă completă de răspuns este urmat de un stadiu în care formarea anticorpilor reîncepe, iar reinjectarea antigenului determină un răspuns secundar tipic și, în ultimul stadiu, anticorpii față de antigenul injectat apar în serul sanguin (828, 890). S-au emis mai multe ipoteze cu privire la reacțiile celulare asociate cu imunotoleranța. Toate aceste ipoteze presupun persistența antigenului în gazdă (628). Michie și colab. (619) au considerat că antigenul interacționează numai cu celulele competente (nu și cu cele precompetente) din aparatul imun. Dacă antigenul este prezent în concentrații joase rezultă o sinteză normală de anticorpi. Invers, în concentrații crescute, antigenul ar produce blocarea specifică a sintezei de anticorpi. Persistența imunotoleranței reclamă, așadar, persistența antigenului în concentrație suficient de mare pentru a bloca sinteza anticorpilor din fiecare celulă nou-maturizată. Se poate presupune că atît celulele competente, cît și cele precompetente sînt afectate de concentrația inițială mare de antigen; celulele competente ar fi neutralizate, iar maturizarea celor precompetente ar fi prevenită (228, 379).

Scanned with OKEN Scanner

Totuși, cantitatea de antigen reținută de embrion sau animalul nou-născut nu este mult diferită de aceea reținută de animalul adult (176). În orice caz, durata toleranței imunologice pare a fi în legătură cu cantitatea de antigen circulant, dat fiind că toleranța față de ASB la șoarece ia sfîrșit cînd ASB devine nedetectabilă în serul sanguin (804), iar la iepuri, toleranța față de ASB se pierde cînd ASB descrește în serul sanguin la mai puțin de aproximativ 10—12 molecule (≈ 0,1 mg) (379, 426). Cu alte cuvinte, o cantitate minimă de antigen circulant este o condiție necesară pentru existența imunotoleranței (48). La animalele nou-născute, care formează cantități foarte mici de γ-globuline, o cantitate extrem de mică de antigen circulant poate fi capabilă să neutralizeze urmele de molecule native de anticorpi formate și poate preveni, printr-un mecanism necunoscut încă, producerea în continuare de anticorpi omologi. Încercările de a evidenția anticorpii în țesuturile animalelor tolerante au dat rezultate negative (793, 804, 883). La animalele adulte sînt necesare cantități mai mari de antigen, pentru că el trebuie nu numai să neutralizeze anticorpii prezenți în circulație și spațiile extracelulare, ci să și prevină producția de molecule native de anticorpi, precum și eliberarea anticorpilor de la locul lor de producere (669). Dacă animalele adulte tolerante sînt inoculate continuu cu antigen, toleranța imunologică poate fi menținută o perioadă îndelungată de timp (228).

Lederberg (510), extinzînd teoria selecției clonale, a oferit de asemenea o explicație a dezvoltării toleranței imunologice dobîndite. El este de părere că introducerea antigenului în timpul imaturității imunologice a animalului ar elimina clonele celulare care sînt specific preselecționate pentru antigenul respectiv. Teoria sa se bazează pe ipoteza că celula purtătoare de anticorpi, în contact cu antigenul, ar putea fi alterată sau chiar distrusă (fenomenul fiind numit „moartea alergică" a celulei imune) și presupune existența anticorpilor specifici, fixați pe suprafața celulei și persistența antigenului în gazdă, pentru a menține o toleranță permanentă (antigenul fiind necesar pentru eliminarea oricăror celule specifice apărute ulterior).

Medawar (605) a emis teoria heterogenă a inducerii toleranței pornind de la postulatul că în receptor există două tipuri distincte de celule: un tip de celule mature, obișnuite, competente imunologic și un al doilea tip de celule, speciale, a căror sensibilitate față de antigen este mai mare și mai îndelungată decît a celor dintîi. Acțiunea inițială a antigenului asupra acestor celule sensibile ar duce la proliferarea lor marcată și la apariția unor populații mari de asemenea celule. În timp ce dozele mici de antigen ar provoca sensibilizarea celulelor mature, ele ar acționa invers asupra acestor populații de celule speciale, care ar deveni tolerante și, prin multiplicare intensă, ar înlocui treptat celulele mature sensibilizate (fig. 85). Această teorie presupune că rezistența antigenului în fața reacției celulelor mature, sensibilizate, este suficientă pentru ca el să poată acționa și asupra populației de celule speciale. Ea nu a putut fi însă susținută mult timp în forma sa originală, deoarece nu a explicat o serie de date experimentale noi. Inducerea toleranței imunologice la tipul de celule speciale ar trebui să fie însoțită de sensibilizarea celulelor competente imunologic care, deși în număr relativ redus, există totuși în receptorul nou-născut. Reacția imună care urmează după sensibilizarea acestora ar trebui să protejeze

Scanned with OKEN Scanner

organismul receptor față de o nouă agresiune antigenică, practicată după 48 de ore, ceea ce însă nu se întîmplă. Mai mult, dozele mici de antigen administrate la animalele nou-născute ar trebui să nu confere protecție, dar s-a observat un fenomen contrar: la aceste animale, dozele mici, inițiale, de antigen realizează

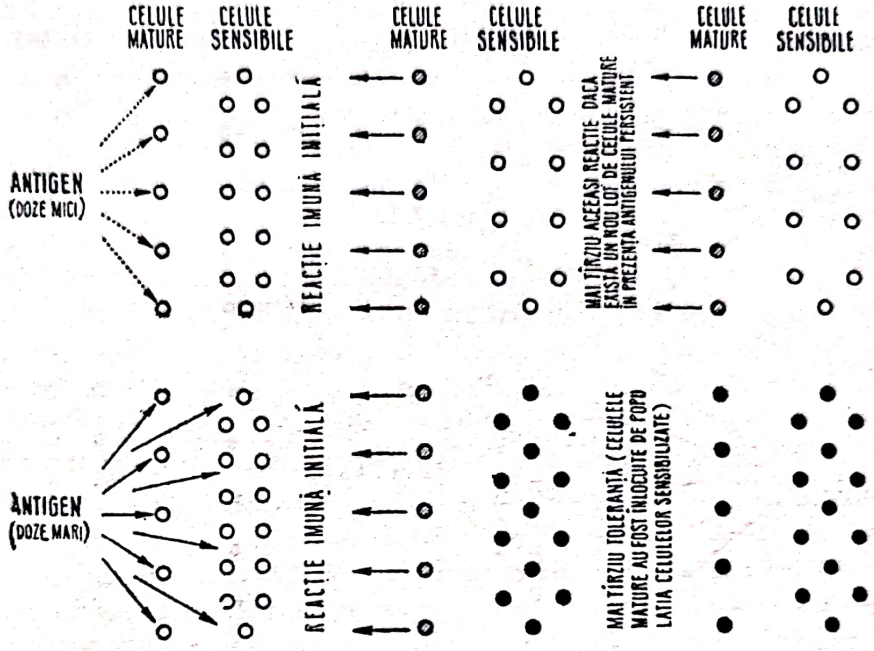


Fig. 85. — Reprezentarea schematică a teoriei heterogene a inducerii imunotoleranței.

Celulele mature (cercuri albe) sînt sensibilizate la antigen (cercuri haşurate), în timp ce celulele speciale (cercuri compacte) devin tolerante sau, conform teoriei selecției clonale, sînt eliminate selectiv [după Michie și Howard (617)].

protecția față de o agresiune antigenică masivă la 48 de ore, în timp ce dozele mari inițiale realizează o „antiprotecție".

Michie și Howard (617) au propus în locul teoriei heterogene a toleranței imunologice, emisă de Madawar (605), teoria omogenă a imunotoleranței. Pe baza datelor lor experimentale, acești autori susțin că teoria celulelor speciale, cu sensibilitate crescută, ar trebui revizuită în sensul de a admite că în decurs de 48 de ore dispare o întreagă generație de celule mature sensibilizate. După Michie și Howard (617), singura celulă capabilă de a se sensibiliza sau de a deveni tolerantă este celula matură imunologic. În această ipoteză, noțiunea de „imaturitate imunologică" a animalului nou-născut devine relativă și, aplicată la nivelul celular, ea cuprinde numai o celulă nediferențiată, în stare să dea, sub impulsul stimulului antigenic, fie unul, fie celălalt răspuns imunologic (fig. 86).

O altă teorie asupra apariției toleranței imunologice aparține lui Gorman (329), care consideră că, în ultimă instanță, această stare este rezultatul înlocuirii celulelor competente imunologic cu alte celule, inactive imunologic. Această teorie este cunoscută sub numele de teoria competiției, iar celulele care pot lua locul sau pot intra în competiție cu celulele imune specifice ca răspuns

Scanned with OKEN Scanner

la acțiunea unui antigen, au fost denumite celule incompetente imunologic sau celule tolerante. Se admite că majoritatea celulelor limfatice proliferate ulterior perioadei fetale, perioadă în care organismul își capătă toleranța față de propriile sale antigene, sînt de fapt celule tolerante față de stimulii antigenici

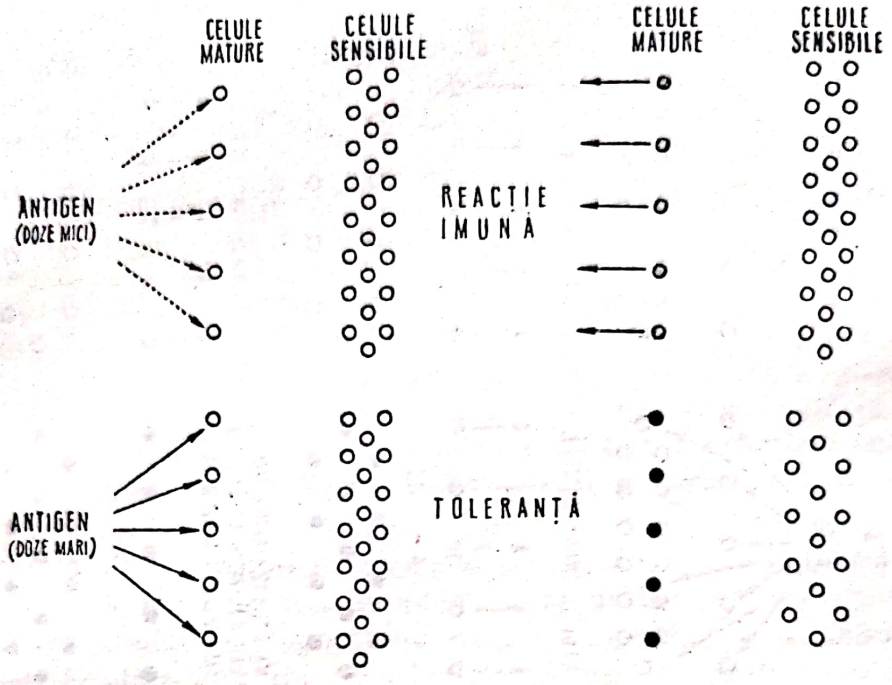


Fig. 86. — Reprezentarea schematică a teoriei omogene a inducerii imunotoleranței.

Numai celulele mature sînt susceptibile acțiunii antigenului care sensibilizează (doze mici) sau induce imunotoleranța (doze mari) [după Michie și Howard (617)].

proprii. Pentru a se menține toleranța față de țesuturile proprii, aceste populații celulare cu toleranță specifică față de antigenele proprii trebuie să persiste. Conform teoriei competiției, datele experimentale pot fi interpretate ca expresia faptului că animalul nou-născut este mai favorabil proliferării celulelor tolerante decît proliferării celulelor imune în prezența unei doze crescute de antigen. Dozele scăzute de antigen modifică balanța în favoarea proliferării celulelor imune față de cele tolerante. O situație intermediară de proliferare atît a celulelor imune, cît și a celulelor tolerante poate surveni în cazul toleranței parțiale. Existența acestor două tipuri potențiale de proliferare, ca răspuns la stimulul antigenic, explică răspunsul dimorf al șoarecelui nou-născut, ca și alternativa proliferării sau neproliferării celulelor, cu sensibilitate crescută, sugerată de Michie și Howard (617). Diferența constă în faptul că celula tolerantă specifică, admisă de ambele teorii (teoria competiției și teoria omogenă), capătă în teoria competiției capacitatea de a se multiplica și de a prelua locul rămas prin eliminarea celulelor imune, care răspund la același stimul antigenic.

Inducerea toleranței față de homografele de piele prin tehnica parabiozei a fost explicată de Nakič și colab. (652), tot pe baza concepției înlocuirii competitive, adică prin înlocuirea celulelor competente imunologic a unui parabiont

Scanned with OKEN Scanner

cu celulele celuilalt parabiont. Acest transfer de la un parabiont la celălalt duce la toleranţa specifică. Transferul are loc prin anastomozele vasculare la locul parabiozei, care se stabilesc începînd din ziua a 4-a. Celulele străine dezvoltă o reacţie antigazdă, care alterează ţesutul limfatic al receptorului şi pe măsură ce celulele limfatice se distrug şi se înlocuiesc cu cele ale donatorului (himerism celular) are loc „desensibilizarea" gazdei şi înlocuirea acestei stări cu toleranţa specifică. Explicaţia propusă pentru incapacitatea receptorului de a elimina grefa în cazul parabiozei este existenţa numărului mare de celule limfatice de la donator pe care le are receptorul şi care proliferează în organismul acestuia, devenind predominante. În acest caz, toleranţa ar depinde deci de un raport favorabil între celulele donatorului şi celulele receptorului. Modificarea acestui echilibru poate duce fie la abrogarea toleranţei, fie la o reacţie fatală grefă-contra-gazdă. Admiţînd ipoteza înlocuirii competitive a celulelor competente imunologic ale gazdei cu celulele donatorului, premisele stării de toleranţă sînt în mod obligatoriu himerismul celular şi reacţia grefă-contra-gazdă. Această ipoteză explică atît inducerea toleranţei prin parabioză, cît şi a toleranţei obţinută prin crearea de himere radiologice sau a toleranţei obţinută la animale nou-născute prin injectarea de celule limfatice omologe.

c) **Caracterele toleranţei imunologice dobîndite.** Imunotoleranţa dobîndită este, în primul rînd, specifică. Astfel, un şoarece tolerant faţă de grefe de piele de la un donator de o anumită linie genetică este netolerant faţă de grefele de piele de la donatori din alte linii genetice. Un şoarece tolerant încetează de a mai fi tolerant şi se sensibilizează sau devine imun, dacă este injectat intraperitoneal cu celule extrase din ganglionii regionali ai unui şoarece de aceeaşi linie genetică, în prealabil imunizat activ faţă de donatorul grefei. Deci imunotoleranţa dobîndită poate fi suprimată. Suprimarea toleranţei imunologice se instalează relativ repede: un şoarece tolerant faţă de o grefă de piele timp de 100 de zile îşi poate pierde toleranţa şi îşi poate reface reactivitatea în mai puţin de 10 zile. Reactivitatea şoarecelui tolerant se poate restabili în 20—40 de zile, chiar numai prin injectarea intraperitoneală a unor celule limfatice din ganglionii regionali ai unui şoarece normal din aceeaşi linie genetică. S-a presupus că aceste celule limfatice sînt încorporate de receptorul tolerant şi reacţionează la acţiunea antigenelor eliberate de grefa tolerată. Această experienţă, realizată de Billingham şi colab. (78), dovedeşte că homografa tolerată continuă să fie o sursă de stimuli antigenici sau, mai exact, de stimuli care ar fi antigenici, dacă gazda ar fi capabilă să răspundă la aceşti stimuli. Generalizînd, se poate emite ipoteza că celulele ţesuturilor normale eliberează în căile limfatice particule sau fragmente subcelulare, care sînt acumulate în ganglionii regionali. (Acesta ar fi un mecanism normal de *clearance* tisular). La şoarecele normal sau tolerant, aceste particule autogene nu produc nici un răspuns imunologic. Ele îşi exercită puterea antigenică numai cînd ating o serie de celule limfatice străine, cum se întîmplă la şoarecele normal după transplantarea ţesuturilor între membrii a două linii genetice diferite sau la şoarecele tolerant după introducerea unor celule limfatice normale în ganglionii inerţi din punct de vedere imunologic. În primul caz, elementele active ale grefei întîlnesc elemente ganglionare active, iar în cel de-al doilea caz se introduc elemente ganglionare active, pe lîngă elementele grefei tolerate; ceea ce trebuie subliniat şi reţinut este faptul

Scanned with OKEN Scanner

că un material complex, de natură subcelulară, este eliberat în mod constant de către celulele țesutului normal.

Restaurarea reactivității normale la șoarecele tolerant arată că toleranța imunologică se datorește lipsei componentei centrale a mecanismului de răspuns imunologic și nu interceptării vreuneia dintre etapele căii eferente sau ale căii aferente ale mecanismului reflex imunologic. Acest fapt este atestat, pe de o parte, de lipsa totală a anticorpilor circulanți față de antigenele care au indus toleranța (331), iar pe de altă parte de abrogarea toleranței și restaurarea reactivității imunologice prin injectarea unor celule competente imunologic (79, 627).

Grefa tolerată continuă să elibereze material cu potențial antigenic și este capabilă în același timp să răspundă unei stări imune, indusă prin intermediar.

În legătură cu teoriile de formare a anticorpilor trebuie subliniat încă un aspect al fenomenului de toleranță. Dacă se admite că formarea anticorpilor este, în ultimă instanță o diversiune sau o schimbare de direcție în sinteza proteică, este logic să se admită că embrionul, a cărui sinteză proteică este deosebit de vie, ar putea fi adaptat să elibereze anticorpi. Lucrările lui Medawar (605) au arătat de altfel că celulele embrionare nu sînt areactive la stimulii antigenici; ele reacționează, însă într-un sens negativ, raportat la standardul celulelor adulte.

În legătură cu persistența antigenului trebuie să fie reținute de asemenea cîteva aspecte: a) cînd stimulul care induce toleranța imunologică este reprezentat de celule viabile, gazda devine o himeră celulară cu celule proprii și celule ale donatorului (73, 899), chiar dacă gradul de himerism este foarte scăzut (104). Celulele donatorului, stabilite în organismul gazdei, asigură persistența antigenelor inductoare ale toleranței imunologice; b) cînd s-a folosit ca stimul antigenic un extract tisular semisolubil sau solubil, nu s-a putut demonstra dacă persistența antigenului este necesară menținerii imunotoleranței. O ipoteză, potrivit căreia n-ar fi necesar ca antigenele să persiste extracelular în gazdă pentru menținerea toleranței imunologice, a fost emisă de Humphrey (428), pe baza unor experiențe cu antigene constituite de proteine purificate și polizaharide bacteriene.

2. FORME DE IMUNOTOLERANȚA ACTIVĂ DOBÎNDITĂ

a) **Imunotoleranța la animalele nou-născute.** Există o serie de circumstanțe, în care administrarea celulelor omologe vii unui animal duce la scăderea reactivității lui față de grefarea ulterioară a aceloraşi celule. Dacă un embrion sau făt de mamifer sau pasăre este supus influenței celulelor omologe vii, efectul acestui tratament este diminuarea puterii sale de a reacționa față de o grefă identică, practicată mai tîrziu, ajungîndu-se chiar la acceptarea acestei homografe întocmai ca pe o autografă; gazda devine o himeră de celule neasemănătoare genetic. Pe aceste date se fundamentează concepția toleranței dobîndite la animalele nou-născute. S-au citat la începutul acestui capitol cercetările lui Billingham și colab. (74), care au reușit să inducă toleranța imunologică la șoareci, prin injectarea unor suspensii celulare provenind de la viitorul donator unor animale nou-născute. O dată devenite adulte, animalele respective s-au dovedit perfect tolerante față de grefe de piele prelevate de la donatorii de

Scanned with OKEN Scanner

celule. Aceiași autori (78) au reușit să inducă toleranța imunologică chiar cu sînge de la donator. Importanța faptului că animalele în stadiu embrionar sau nou-născute sînt incompetente imunologic constă tocmai în aceea că aceste animale, devenite adulte și, deci, competente imunologic, rămîn receptive pentru celulele donatorului inițial, fiind incapabile de vreun răspuns imunologic la acțiunea antigenelor acestui donator. Inducerea imunotoleranței prin pretratamentul gazdei în stadiu embrionar sau imediat după naștere, cu unele antigene ale donatorului, variază cu specia, linia genetică și sistemul imunologic al gazdei și calea de administrare a antigenului. Aparent, la aceste animale survine o alterare profundă, prin stabilirea unui stadiu de imunotoleranță relativ permanentă. Această toleranță are un înalt grad de specificitate și nu se extinde la animale din alte linii genetice. Rezultate asemănătoare a obținut și Hašek (374) pe pui ținuți înainte de ecloziune în parabioză cu alți embrioni de pui, neînrudiți genetic între ei. De asemenea, Billingham și colab. (79) au arătat că injecții intravenoase de celule splenice de la șoareci din linia genetică CBA la șoareci din linia genetică A în vîrstă de 4 zile induc toleranța față de grefa ulterioară de piele. Injectarea acestor celule pe aceeași cale, la vîrsta de 7 zile, provoacă o rezistență crescută față de homografa ulterioară de piele. Aceiași autori (71), printr-o tehnică originală ingenioasă, au injectat la șoareci nounăscuți, în vena facială anterioară, suspensii de celule omologe provenind din splină, noduli limfatici sau alte organe. Datele obținute astfel au marcat o etapă nouă în cunoașterea mecanismului imunotoleranței dobîndite.

Durata în care injecțiile intravenoase de celule omologe la șoareci nounăscuți induc o stare de toleranță imunologică este practic, de numai 4 zile. În perioada de vîrstă de 4—7 zile, aceste injecții nu mai induc toleranța imunologică, dar nici nu sensibilizează animalul (fenomen demonstrat prin eliminare de tip secundar încercată pe animalele devenite adulte) și, uneori, în a 7-a zi de la naștere, șoarecii, sub un astfel de tratament, prezintă un început de sensibilizare. Pe baza acestor date s-a ajuns la concepția inițială a existenței unei „perioade nule" între perioada de toleranță din primele zile după naștere și sensibilizarea obișnuită a vîrstei adulte.

Prima dificultate experimentală constă în alegerea celulelor de injectat. Celulele limfoide adulte (inclusiv cele sanguine) sînt cel mai ușor de procurat și foarte eficace în producerea toleranței. Din păcate, fiind competente imunologic, ele produc o formă tipică sau subclinică de reacție grefă-contra-gazdă. Acest inconvenient poate fi evitat prin folosirea limfocitelor sau a sîngelui fetal sau, în cazul șoarecelui, a măduvei hematogene adulte (79). Folosirea hibrizilor este limitată la aplicarea experimentală și nu poate avea nici o consecință clinică. Dacă, la scurt timp după naștere, animalului tratat în prealabil cu celule recoltate de la viitorul donator i se aplică un homotransplant de piele (răstimpul de la injectare pînă la grefare trebuie să coincidă cu perioada în care animalul normal din specia respectivă devine matur din punct de vedere imunologic), transplantul poate evolua în trei moduri: a) se elimină într-un timp mai scurt decît durata medie a eliminării la animalul netratat, ceea ce înseamnă că tratamentul prealabil nu a avut efect; b) supraviețuiește cît și grefa aplicată unui animal netratat, deci tratamentul prealabil nu a avut nici un efect; c) supraviețuiește mai mult decît grefa aplicată animalului netratat, acesta fiind

Scanned with OKEN Scanner

rezultatul care se obține în mod normal. Durata de prelungire a supraviețuirii depinde, în parte, de vîrsta embrionului sau a animalului nou-născut, de cantitatea de celule injectate și de calea de administrare și, în parte, de relațiile genetice dintre donator și gazdă. În cele mai bune cazuri, imunotoleranța dobîndită este permanentă, homografele comportîndu-se ca autografele.

Recent, însă, Howard și colab. (417) au arătat că și animalele nou-născute au un oarecare grad de reactivitate, datorită, probabil, unui număr redus de celule competente imunologic. Acești autori au injectat un număr mic de celule omologe iradiate letal (care nu puteau, deci, acționa împotriva gazdei) la șoareci nou-născuți, presupunînd că dacă la aceste animale ar exista celule competente imunologic, chiar în număr mic, ele ar trebui să reacționeze, cel puțin pentru un interval scurt de timp. După 2 zile s-au injectat celule omologe viabile, fără să se producă splenomegalia (fenomen sesizat de Simonsen ca răspuns al șoarecelui nou-născut la injecția de celule vii omologe, competente imunologic în cadrul reacției grefă-contra-gazdă). Această observație a impus concluzia că celulele vii au fost eliminate de către șoarecele sensibilizat prin prima injecție de celule iradiate și că, deci, șoarecele nou-născut se află într-o oarecare stare de sensibilizare.

În continuare, Brent și Gowland (101) au demonstrat că în prima săptămînă de viață, inducerea imunotoleranței este în funcție de doza de antigen administrată. În timpul perioadei nule, animalele pot fi făcute tolerante, dacă doza, administrată într-o singură inoculare, este constituită de un număr mare de celule. Cîteva zile mai tîrziu, aceeași doză nu mai este eficientă, fapt explicat de Howard (417) prin existența în organismul animalului nou-născut a unui număr mic de celule competente imunologic în perioada nulă, număr în creștere rapidă în primele zile de viață. S-ar putea presupune că inducerea imunotoleranței la animalul nou-născut se reduce la problema dozei adecvate de celule de orice fel, dar această presupunere nu corespunde întocmai datelor experimentale. Apar diferențe importante de la o linie genetică la alta; la unele animale, inducerea imunotoleranței se realizează cu ușurință, la altele este imposibil de obținut sau se obține foarte greu. Diferența existentă între alelele aceluiași *locus* H poate fi atît de puternică, încît să nu poată fi neutralizată. Dacă diferențele între donator și receptor nu sînt la nivel de *locus* H-2, ci la nivelul altor *loci,* mai slab antigenici, toleranța se poate obține nu numai pe cale intravenoasă, foarte traumatizantă, ci și pe cale intraperitoneală (85, 541). Speciile diferă foarte mult între ele în privința maturizării imunologice și, în consecință, perioada favorabilă pentru inducerea imunotoleranței poate fi mai lungă sau mai scurtă.

Rolul persistenței celulelor injectate în menținerea toleranței imunologice este, așa cum s-a mai arătat, foarte important. Există o legătură directă între imunotoleranță și persistența celulelor donatorului în măduva hematogenă și organele limfatice ale gazdei (899). Gazda tolerantă s-a dovedit a avea celule de tipul donatorului și/sau antigenele acestuia, deși concentrația lor poate fi foarte scăzută (619). Este posibil ca celulele donatorului să se înmulțească mai rapid decît celulele receptorului și să provoace distrugeri ale acestora din urmă. Termenul de „înlocuire competitivă", recomandat de Nakič și colab. (652), ar explica acest proces. Fenomenul poate fi, într-adevăr, întîlnit, dar nu este deter-

Scanned with OKEN Scanner

minant în dobîndirea imunotoleranței, deoarece în unele cazuri, celulele donatorului nu pot reacționa față de gazdă și, totuși, imunotoleranța se instituie. Billingham și Brent (73) consideră că himerismul celular ar putea fi evidențiat prin detectarea antigenelor de transplantare ale donatorului în splina animalului tolerant. Astfel, de la animalul tolerant (A) față de țesuturi provenind de la animalul (B) s-ar putea inocula celule splenice unui alt animal adult din aceeași linie genetică cu grefarea consecutivă a acestuia din urmă, cu piele recoltată de la animalul (B). Dacă antigenele animalului (B) au ajuns în organismul receptorului de grefă de piele, o dată cu celulele splenice inoculate, grefa urmează să sufere o eliminare de tip secundar. Pe baza acestui model experimental s-a stabilit că șoarecii toleranți au fost himere celulare (himere antigenice), în timp ce la șoarecii netoleranți sau parțial toleranți, himerismul nu a fost detectat. Martinez și colab. (583) au testat capacitatea șoarecelui tolerant de a transfera această toleranță la nou-născuți cu aceeași constituție genetică, socotind că realizează un test mai critic de evidențiere a persistenței antigenului (deoarece, în acest caz, ar fi necesară transferarea tuturor antigenelor donatorului și nu numai a unuia singur, ca în cazul transferului de sensibilitate). Combinînd cele două teste de transferare, Eichwald (239) a arătat că persistența imunotoleranței nu necesită prezența celulelor donatorului, ci numai a antigenului de transplantare. De altfel s-a demonstrat inducerea imunotoleranței temporare la animale nou-născute prin injectare de antigene solubile (823), a căror administrare repetată provoacă adesea o stare continuă de toleranță imunologică. Imunotoleranța indusă prin celule care nu se divid, cum sînt eritrocitele de pui, depinde de influxul continuu al acestor celule, dispariția imunotoleranței coincizînd cu dispariția eritrocitelor donatorului din sîngele receptorului. Concluzia lui Mitchinson (628), potrivit căreia, pentru a se obține o toleranță continuă, antigenul trebuie să fie persistent în organismul tolerant, este fundamentată de toate observațiile cunoscute.

Problema toleranței imunologice se complică mult la animalele heterozigote și, în special, la om. S-a încercat inducerea imunotoleranței la șobolanul nou-născut prin injectarea unor celule recoltate de la mai mulți donatori neînrudiți cu receptorul (85), cu rezultate foarte variabile, condiționate în primul rînd de vîrsta donatorului și de tipul celulei folosite. În general, toleranța imunologică obținută prin folosirea celulelor ganglionare de la un grup de animale adulte este foarte scăzută; celulele măduvei osoase s-au dovedit ceva mai eficace. Se pare că în acest caz intervin și reacțiile celulelor diferiților donatori între ele, ca reacții grefă-contra-gazdă. Rezultate mai bune s-au obținut utilizîndu-se celule fetale de la mai mulți donatori, celule lipsite de capacitatea de a reacționa încrucișat. S-au făcut de asemenea încercări de inducere a imunotoleranței pe rațe de Pekin (377) și pe membrana corioalantoidă (403). În general, tentativele de inducere a unei toleranțe imunologice polivalente nu au dat rezultate concludente și nici, cel puțin, promițătoare. Un model experimental mai complicat de inducere a imunotoleranței la șoareci nou-născuți este acela realizat de Voisin și Kinsky (924). Într-un studiu asupra protecției față de sindromul de *runt* al șoarecilor nou-născuți, acești autori au obținut, în urma realizării acestei protecții, inducerea imunotoleranței față de grefele de piele. Ei au lucrat pe 450 de șoareci nou-născuți din linia genetică A, pe care i-au

Scanned with OKEN Scanner

împărţit în trei loturi: animalele din primul lot au primit celule splenice adulte de la şoareci din linia genetică CBA şi ser imun preparat prin imunizarea şoarecilor adulţi CBA faţă de ţesuturile liofilizate ale unor şoareci nou-născuţi din linia genetică A sau faţă de tumori ale unor şoareci din aceeaşi linie genetică. Ultimul ser a conţinut anticorpi facilitanţi; animalele celui de-al doilea lot, constituit din şoareci nou-născuţi, au primit acelaşi număr de celule splenice CBA (din aceleaşi preparate) şi aceeaşi cantitate de ser normal CBA; în sfîrşit, a treia serie de animale a fost seria de control. Şoarecii astfel pregătiţi au fost apoi grefaţi cu piele de la şoareci CBA (tabelul 38).

Tabelul 38

Creşterea în proporţie şi calitate a toleranţei faţă de grefele de piele prin tratament specific (facilitare) al şoarecilor nou-născuţi. Număr şi procent de grefe eliminate sau tolerate în mod diferit *

Animale tratate la naştere cu celule homologe plus:	Numărul de animale grefate care au supravieţuit peste 16 zile	Eliminare normală	Toleranţă nedeterminată	Toleranţă parţială	Toleranţă permanentă
Ser normal CBA	37 (considerat 100%)	4 (10,8%)	3 (8,1%)	9 (24,3%)	21 (56,8%)
Ser imun CBA (facilitant)	79 (considerat 100%)	0 (0%)	7 (8,9%)	3 (3,8%)	69 (87,3%)
Semnificaţia diferenţelor observate			0,014	3,36	3,67
Probabilitatea ca diferenţele observate să se datoreze întîmplării		1%	99%	10^{-4}	$< 10^{-4}$

* După Voisin şi Kinsky (924).

Animalele din primul lot au prezentat o creştere semnificativă, cantitativă şi calitativă, a toleranţei faţă de grefele de piele CBA, în comparaţie cu acelea din lotul al doilea (tabelul 38). Specificitatea imunologică a antiserurilor folosite a fost confirmată prin testul de hemaglutinare şi testul de imunotoxicitate specifică.

Un interesant model experimental a fost descris de Hašek (375), care prin tehnica „parabiozei embrionare" de stabilire a unor anastomoze sincoriale artificiale între doi embrioni de pasăre a reuşit să inducă toleranţa unui parabiont faţă de ţesuturile partenerului său.

O altă serie de cercetări experimentale a dus la constatarea că celulele unor organe sînt mai eficace în producerea imunotoleranţei decît altele, cele mai eficiente fiind celulele ganglionilor limfatici şi splinei, urmate de celulele din măduva osoasă şi timus (84), iar mai puţin eficiente fiind celulele testiculare (487, 899). Există, deci, o specificitate histologică în această privinţă.

Pe de altă parte, toleranţa imunologică nu se extinde la toate ţesuturile unui donator. De exemplu, leucocitele pot fi tolerate în timp ce grefa de piele

Scanned with OKEN Scanner

provenind de la același donator este eliminată (80, 810). Acest fenomen a fost denumit „toleranță restrînsă" (86) și s-a dovedit a depinde de cantitatea de antigen din celulele transferate.

Toleranța față de celulele tumorale se obține, în general, mai ușor decît față de celulele normale (76, 79), iar cauza acestui fapt pare a fi proliferarea intensă a grefei tumorale.

Nu s-a stabilit pînă în prezent dacă diferențele observate între țesuturile normale reflectă diferențe ale distribuției și cantității de antigen sau dacă este vorba și de o diferență calitativă a antigenelor din diverse organe. În cursul studiilor de inducere a toleranței prin injecții de celule limfoide la animale nou-născute s-a observat că unele celule limfoide sînt mai eficace decît altele (73, 575). În unele cazuri, rezistența șoarecilor nou-născuți la stimulul de inducere a imunotoleranței a fost atribuită stadiului relativ avansat de maturitate imunologică a gazdelor (73); în alte cazuri, fenomenul s-a explicat prin relațiile genetice dintre donator și receptor, dat fiind că șoarecii nou-născuți dintr-o anumită linie genetică pot să răspundă pozitiv la inocularea celulelor prelevate de la donatori dintr-o linie genetică și să fie rezistenți la încercările de inducere a toleranței imunologice prin injectarea celulelor provenind de la animale dintr-o altă linie genetică (73, 575). Argyris (25) a evaluat reacția față de homografe, injectînd celule splenice de trei linii genetice de șoareci (CAB1/C, CBA și A) la nou-născuți homozigoți, omologi sau hibrizi de tip F_1 și a urmărit rezultatele prin tehnica lui Simonsen (816) pentru indicatori splenici și hepatici. Folosind diferite variante experimentale, acest autor a reușit să stabilească relația dintre maturitatea imunologică, pe de o parte, și caracterele genetice ale gazdei și ale donatorului de grefă, pe de altă parte, ca o expresie a reactivității la homografă. Observațiile actuale sugerează că șoarecii nou-născuți de diferite linii genetice răspund în mod diferit la acțiunea antigenelor de transplantare. Aceste variații ale răspunsului imunologic al șoarecilor nou-născuți sînt influențate în mare măsură de relațiile genetice dintre gazdă și donator.

Un fenomen interesant, legat de corelația dintre durata persistenței antigenului în organismul receptorului și durata toleranței imunologice, a fost semnalat de Billingham și Brent (73), sub denumirea de „toleranță disociată". Injectînd celulele unui hibrid la un animal nou-născut, ei au realizat inducerea toleranței față de țesuturile unuia dintre părinții hibridului și nu față de țesuturile hibridului, ceea ce nu se poate explica dacă admitem existența unei corelații strînse între prezența celulelor antigenice și imunotoleranță. Același fenomen a fost reprodus și de alți autori (85, 541), prin inocularea unor celule omologe masculine unui animal nou-născut de sex feminin. În acest caz, receptorul a devenit tolerant numai față de o parte din totalitatea antigenului injectat și anume în sensul în care toleranța se putea obține mai ușor. Explicația acestui fenomen este greu de dat. S-ar părea că este vorba de obținerea toleranței față de anumite antigene mai slabe, în timp ce antigenele puternice continuă să genereze reacții care duc la eliminare (401).

b) **Imunotoleranța la animalele adulte.** Ușurința de inducere a imunotoleranței la animalele nou-născute este legată de proporția mare de celule imature ale acestor animale. Obținerea toleranței imunologice la animalele adulte este însă mult mai dificilă, din cauza proporțiilor mari de celule mature. După

Scanned with OKEN Scanner

cum s-a arătat, primul fapt stabilit în încercările de a se induce imunotoleranța a fost că ea se poate realiza în perioada perinatală. Următorul pas s-a făcut o dată cu stabilirea faptului că inducerea toleranței imunologice nu este strict legată de această perioadă și că ea poate fi realizată și la populațiile celulare adulte. Condiția care s-a dovedit necesară în acest caz pentru ca celulele să devină tolerante a fost ca ele să fie expuse la doze foarte mari de antigen pentru o lungă perioadă de timp. Primele indicații asupra faptului că toleranța poate fi indusă artificial și la animalele adulte aparțin radiobiologilor. Astfel, Main și Prehn (550) au arătat că șoarecii, care au fost iradiați cu o doză letală de raze Röntgen și au fost protejați prin injectare de măduvă hematogenă provenind de la un hibrid de tip F_1 derivat din linia genetică a animalelor iradiate și de la un animal dintr-o altă linie genetică, tolerează ulterior grefa de piele de la părintele de linie genetică străină al hibridului F_1. Ulterior s-a arătat că, într-adevăr, toleranța poate fi indusă la șoareci iradiați letal cu raze Röntgen și tratați cu măduvă omologă sau heterologă.

Inducerea toleranței imunologice la animalele adulte s-a realizat prin mai multe metode experimentale: a) parabioză între animalele adulte de constituție genetică diferită (572, 578, 580, 648, 649—651, 766, 810); b) injecții masive și repetate de antigene de la donator (celule sau grefe mari de piele) (577, 805, 975); c) realizarea unui himerism celular la receptor prin injectare de celule splenice de la părinți la hibrizi de tip F_1.

Parabioza. În cazul parabiozelor, gradul de toleranță obținut pentru o grefă de piele ulterioară depinde de durata stării de parabioză și de diferențele antigenice. Toleranța completă față de antigenele cromozomului Y de sex se poate obține după o perioadă scurtă de parabioză, de 1—2 săptămîni (572, 810), pe cînd diferențele antigenice puternice, cum sînt cele determinate de alelele de *locus* H-2 fie că provoacă moartea parabiontului, fie că necesită o parabioză îndelungată, de mai multe luni, pentru a se induce starea de imunotoleranță (572, 810). Prin parabioză s-au obținut și stări intermediare (578).

Folosind parabioza între șoareci care nu diferă genetic la nivel de *locus* H-2, unii autori (438) au urmărit rolul pe care îl poate avea o reacție simultană grefă-contra-gazdă în inducerea imunotoleranței la animalele adulte. În acest scop au fost studiați comparativ parabionți expuși influenței unui antigen străin de cei doi parteneri ai parabiozei și parabionți expuși influenței unui antigen comun și unei reacții grefă-contra-gazdă. Rezultatele au arătat că inducerea toleranței față de antigenul străin de cei doi parabionți (în special, celule provenind de la animale din linia genetică CH3) este ușurată la șoareci de genotipul AKR, cînd are loc în același timp o reacție grefă-contra-gazdă. În cursul experiențelor lor Nakič și Silobrčic (650, 651) au observat că o parabioză de scurtă durată (5—6 zile) între șobolani adulți Wistar Y59 de linii genetice diferite poate fi urmată de o perioadă de depresiune imunologică nespecifică, în care homografele de piele de la animale din alte linii genetice au o perioadă prelungită de supraviețuire (649). După 3 săptămîni de la parabioză, însă, homografele de piele de la animale de linie genetică străină parabionților sînt eliminate, în timp ce homografele de piele de la animale din linia genetică a parabiontului pot fi tolerate uneori permanent. Dacă homografele de piele de la animale din linia genetică a parabiontului sînt aplicate o dată cu instituirea

Scanned with OKEN Scanner

parabiozei, toleranța față de aceste homografe este parțială: dacă ele se aplică la 4—8 săptămîni de la instituirea parabiozei sînt tolerate indefinit. Menținerea parabiozei între șobolani din liniile genetice Y și W, timp de 20 de zile, a dat însă rezultate negative; animalele au murit fie prin separarea spontană a parabionților, fie prin boala parabiotică (651).

Parabiontul tolerant devine o himeră celulară permanentă și suferă o involuție a țesutului său limfoid, unele animale prezentînd manifestări evidente ale unei reacții grefă-contra-gazdă (648). Regenerarea țesutului limfatic al parabiontului se face foarte lent, ceea ce explică perioada de depresiune imunologică care apare imediat după întreruperea parabiozei.

Concluziile rezultatelor obținute pe acest model experimental au fost următoarele: a) ambii parabionți trebuie să fie competenți imunologic și neînrudiți genetic; b) parabioza determină mai întîi inducerea unei stări de sensibilizare; c) animalul sensibilizat devine ulterior specific areactiv; d) toleranța imunologică este precedată de o perioadă scurtă depresivă nespecifică a reacției imune; e) imunotoleranța specifică este totdeauna un fenomen unilateral, apărînd numai la unul din parteneri față de țesuturile celuilalt; f) animalul tolerant devine o himeră celulară permanentă; g) imunotoleranța se asociază totdeauna cu o hipoplazie limfoidă, probabil ca urmare a unei reacții grefă-contra-gazdă.

Explicația propusă de Nakič și colab. (652) pentru inducerea toleranței imunologice prin parabioză este înlocuirea competitivă a sistemului imun al gazdei cu elementele sistemului imun al donatorului, ca rezultat al transferului de celule competente imunologic de la un parabiont la celălalt prin canalele de anastomoză vasculară. Competiția care ar avea loc între celulele imunizate ale gazdei și celulele donatorului ar afecta sistemul limfatic al gazdei, ducînd la deprimarea nespecifică a reacțiilor imune. În anumite cazuri, condiționate de puterea antigenului donatorului, acesta ar putea extermina țesutul limfatic al gazdei și l-ar înlocui cu țesut limfatic propriu. Ar rezulta astfel o toleranță specifică față de grefele donatorului, iar boala parabiotică ar fi o manifestare a atacului imunologic al celulelor donatorului față de gazdă. Prima grefă încrucișată (piele transplantată de la un parabiont la celălalt) poate fi eliminată parțial, dar o a doua grefă, aplicată cu 1—2 luni mai tîrziu, este bine tolerată, în timp ce o a treia grefă simultană de la un animal de linie genetică diferită de aceea a parabionților este distrusă prompt. Teoria competiției, emisă de Nakič și colab. (649), oferă explicații atrăgătoare; totuși, mecanismul inducerii imunotoleranței prin parabioză este departe de a fi binecunoscut. Un rol important revine în acest caz dozei de antigen și puterii antigenice a animalului donator. Doza de antigen este în corelație cu suprafața anastomozelor vasculare și cu durata unirii parabiotice. Puterea antigenului depinde de factorii genetici și poate fi apreciată printr-o reacție prealabilă grefă-contra-gazdă. Observația generală potrivit căreia toleranța imunologică se induce mai ușor prin antigene slabe decît prin antigene puternice se reflectă în experiențele de parabioză prin aceea că în cazul antigenelor puternice, parabioza trebuie menținută mai mult timp.

Un alt model experimental, foarte comod, este parabioza dintre șoareci hibrizi de tip F_1 cu un șoarece aparținînd uneia din liniile genetice ale părinților. Hibridul F_1 posedă suficient de multe antigene străine de fiecare dintre

părinții săi și nu se produce reacția de grefă-contra-gazdă sau gazdă-contra-grefă simultan, în fiecare partener, ceea ce ar îngreuia foarte mult interpretarea fenomenelor. McBride și Simonsen (594) au urmărit fenomenele celulare și umorale într-o serie de asemenea parabioze. Astfel, în combinația parabiotică dintre șoareci [ST×A(H-2^K)] F_1 și C3H(H-2^K), ei nu au obținut toleranță imunologică completă. Inducerea imunotoleranței parțiale în această combinație, care este o combinație de animale cu antigene puternice, a necesitat 5 luni de parabioză, timp în care s-a realizat o creștere progresivă a circulației încrucișate, iar țesuturile limfatice ale hibridului F_1 (mai ales splina) au fost treptat repopulate cu cantități din ce în ce mai mari de celule C3H: colonizarea în sens invers a fost neglijabilă. Partenerul C3H a prezentat titruri ridicate de anticorpi umorali diferiți de anticorpii unui antiser ST/A convențional, produs de animalele C3H, în sensul că nu au fost citotoxici și n-au dat reacții încrucișate cu șoareci DBA/2 au eritrocite de grup A, ca anticorpii convenționali. Toleranța imunologică obținută la partenerul C3H a fost nespecifică, fapt demonstrat prin supraviețuirea îndelungată a unor grefe de piele provenind de la șoareci DBA/2, aplicate parabiontului tolerant. Rezultatele obținute sugerează, deci, că toleranța indusă prin parabioză nu este rezultanta recolonizării partenerului parental cu țesut limfatic de la hibridul F_1. Dacă acest fenomen survine totuși, el are loc în orice caz după ce imunotoleranța a atins un anumit stadiu. Lipsa de reacție încrucișată cu eritrocitele șoarecilor DBA/2, ca și toleranța față de grefele de piele provenind de la aceste animale, reflectă inducerea unei toleranțe și față de antigene apropiate probabil de ST/A. În acest caz, nespecificitatea aparentă este compatibilă cu ipoteza potrivit căreia toleranța imunologică este specifică pentru antigenele folosite în includerea ei.

Administrarea masivă și continuă de antigen. Cantitatea de celule antigenice (sau cantitatea de antigen) necesară inducerii imunotoleranței la animalul adult este mult mai mare decît la animalul nou-născut. Prima condiție este, deci, administrarea unei cantități suficient de mari de antigen sau a unui număr suficient de mare de celule antigenice receptorului și menținerea acestui nivel pe o durată de timp suficient de lungă. În aceste condiții ar trebui să se poată obține imunotoleranța la animalul adult, ca și la animalul nou-născut, indiferent dacă deosebirile antigenice dintre donator și receptor sînt mici sau mari. Fără îndoială, aceste cerințe pot fi realizate mai ușor la animalele nou-născute, în special prin folosirea căii intravenoase de administrare. Shapiro și colab. (805) au obținut toleranța imunologică la șoareci adulți față de antigenele de *locus* H-2 prin injectare masivă (doză de 10^9 celule) repetată frecvent într-o perioadă de 7 săptămîni pe mai multe căi (intravenos și intraperitoneal) de celule provenind de la donator. Diferențele de *locus* H-2 între receptor și donator au fost destul de slabe (alelele *a* și *k*). Instalarea imunotoleranței a fost urmărită prin grefe de piele de la hibridul F_1, care a fost obținut prin încrucișarea celor două animale și care a avut ambele antigene H-2 în cantitate mai mică. Rezultatele lui Shapiro și colab. (805) au fost parțial confirmate de Brent și Gowland (102), care au găsit însă calea intraperitoneală ineficace. Imunotoleranța obținută pe cale intravenoasă a fost precedată de o scurtă perioadă de sensibilizare, iar șoarecii nu au avut anticorpi serici față de celulele injectate. Medawar (607) a arătat că administrarea diferitelor extracte celulare care conțin antigene poate fi urmată

Scanned with OKEN Scanner

fie de sensibilizare, fie de diminuarea răspunsului imunologic, în funcție de calea folosită în obținerea extractului. Tabelul 39 ilustrează dependența de doză a inducerii imunotoleranței. Șoarecii CBA se deosebesc de șoarecii A printr-un *locus* H-2 de histocompatibilitate puternică. Inducerea imunotoleranței în acest caz necesită doze de aproximativ 20 de ori mai mari decît în cazul folosirii unor linii genetice de șoareci care diferă printr-un antigen H-2 slab (331). S-au făcut studii experimentale amănunțite asupra modalității de inducere a imunotoleranței la șoareci adulți prin diferite doze de antigen (celule vii, homogenate de țesuturi sau extracte tisulare) (tabelul 39).

Tabelul 39

Relația dintre doza de celule ale donatorului administrată și inducerea toleranței imunologice la receptor*

Numărul de celule de șoarece (CBA×A)F1 administrate (×10⁶)	5,00	2,50	1,25	0,62	0,31
Procente de imunotoleranță indusă	100	70	43	0	0

* După Brent și Gowland (103).

Dacă bariera genetică dintre donator și receptor este slabă, imunotoleranța poate fi indusă la animalele adulte. Șoricioaicele A și C57BL/1 pot deveni tolerante față de grefe izogenice de piele de la șoareci masculi prin administrare intravenoasă de celule splenice provenind de la aceștia (571). McKhann (598) a arătat că infectarea intraperitoneală cu 200×10^6 celule splenice induce imunotoleranța la o sublinie coizogenă de șoareci C57, la care donatorul și receptorul se deosebesc numai la nivel de *locus* H-3. Răspunsul imunologic s-a dovedit a fi în funcție de doză, dozele mici provocînd imunizarea, dozele mari imunotoleranța, iar cele intermediare neavînd nici un efect asupra duratei de supraviețuire a grefei de piele. Există în literatură date asupra obținerii toleranței imunologice pentru antigenele de *locus* H-1 și H-3, printr-o singură injecție de celule vii antigenice (347, 579).

Injecțiile repetate de celule vii s-au dovedit de asemenea eficace. Prin injectare repetată, timp de 7 săptămîni, a unor celule splenice de la donator la receptor, alternînd calea intravenoasă cu cea intraperitoneală, s-a reușit să se depășească o barieră genetică puternică, cum este aceea reprezentată de antigenul de *locus* H-2 (579, 805). Prin această metodă, inducerea imunotoleranței față de antigene mai slabe a fost obținută și de alți autori (331).

De asemenea, s-a încercat inducerea toleranței imunologice la animale adulte cu ajutorul preparatelor proaspete de celule dezintegrate. Astfel s-a obținut inducerea imunotoleranței pentru antigenul masculin la femele izogene, printr-o serie de injecții de asemenea preparate, obținute din amestec de celule splenice, hepatice și renale (462, 529) sau din celule splenice (582). Martinez și colab. (582) au indus starea de imunotoleranță specifică prin injecții repetate de homogenate celulare la animale cu compatibilitate pentru antigenul de *locus* H-2 și la animale incompatibile pentru acest antigen. Această stare a depins de relațiile genetice dintre donator și receptor, de doza de antigen, de numărul de injecții și de calea de administrare.

Scanned with OKEN Scanner

Medawar (607) a obținut o ușoară prelungire a supraviețuirii grefelor de piele cu ajutorul injectării unor preparate semisolubile sau solubile din celule limfatice. Rezultatele au fost condiționate de calea de administrare și de felul preparatului (semisolubil sau solubil), realizîndu-se fie sensibilizare, fie un oarecare grad de toleranță. Extractele antigenice administrate pe calea eficace, dar în forma nesensibilizantă, pot induce un oarecare grad de toleranță imunologică.

Transfuzia sanguină ca metodă de inducere a imunotoleranței. În inducerea toleranței s-a încercat și metoda transfuziilor multiple. Hašek și Puza (380) au obținut pe cîini adulți o toleranță parțială față de homografa de rinichi prin transfuzii multiple repetate de la donator la receptor. Fowler și colab. (281) nu au obținut însă toleranță față de grefa de piele prin această metodă, chiar cînd receptorul a fost foarte tînăr. Exsanguinotransfuzia a fost folosită de Gombos și colab. (318). Ei au practicat exsanguinotransfuzia la cîini mici între prima și a 3-a zi de viață și, apoi, la diferite intervale de timp, au efectuat transplantări de piele și rinichi de la donatorul de sînge la animalul exsanguinat. Din 15 cîini cărora li s-au transplantat rinichi de la donatorul de sînge transfuzat, transplantul a supraviețuit numai la 5, la ceilalți 10 fiind eliminat la intervalul standard de timp de 3—8 zile. Cele 5 cazuri reușite de transplantare au avut o perioadă de supraviețuire, după cum urmează: 23 și 30 de zile la 2 animale, la care moartea a survenit accidental, și peste 2 ani la celelalte 3 animale. La ultimele 3 animale, rinichiul transplantat a funcționat normal, menținînd singur homeostazia receptorului și s-a comportat, morfologic și funcțional, ca o grefă autologă. Grefele de piele aplicate concomitent acestor animale au avut o durată variabilă de supraviețuire: în unele cazuri, supraviețuirea lor a fost de peste 700 de zile, dar în altele, ele au fost eliminate mai repede, fără a influența toleranța animalului la grefa renală, care s-a menținut într-o bună stare funcțională. În cazurile citate nu s-au înregistrat reacții grefă-contragazdă. Owe și Linder (685) au semnalat că o homografă de ovar acceptată pentru o perioadă mai lungă de timp face ca receptorul să accepte ulterior o homografă de piele de la același donator sau de la un donator cu un genotip apropiat, homografă care, altfel, este eliminată prompt. Fenomenul nu este influențat de ablația ovarelor proprii ale receptorului, deoarece a putut fi reprodus și la receptorii cărora nu li s-au extirpat ovarele proprii. Pentru ca grefa de piele să fie tolerată, ea trebuie să fie aplicată după o perioadă de timp destul de lungă de la efectuarea grefei de ovar. Pentru menținerea toleranței la grefa de piele, grefa prealabilă de ovar este o condiție obligatorie a acestui tip de experiment, realizîndu-se astfel o supraîncărcare cu antigene de la donator, care favorizează acceptarea prelungită a grefei de piele.

3. INDUCEREA IMUNOTOLERANȚEI FAȚĂ DE UN ANTIGEN DUPĂ FORMAREA DE ANTICORPI SPECIFICI FAȚĂ DE ACESTA

S-a arătat că toleranța imunologică poate fi indusă la animale nou-născute sau la animale adulte prin doze mari de antigen (74, 134, 158, 366, 464, 823, 962) și s-a afirmat despre acest fenomen că reprezintă o toleranță care „nu recunoaște natura antigenică" a moleculei. În general, în toate experiențele

Scanned with OKEN Scanner

de inducere a imunotoleranței s-au folosit animale inițial neimunizate. Dorner și Uhr (222) au încercat să realizeze toleranța față de un anumit antigen la animale imunizate în prealabil cu același antigen. Rezultatele lor au arătat

Tabelul 40

Inducerea toleranței imunologice cu doze mari de ASB la iepuri după imunizarea lor prealabilă cu același antigen *

Vîrsta	Cantitatea de ASB folosită pentru imunizarea primară (mg)	Toleranța indusă cu doze mari de ASB
Nou-născut	0	4/4
Adult	0	2/9
Adult	50	2/3
Adult	10	4/9
Adult	1	1/2

* După Dorner și Uhr (222).

că iepurii adulți imunizați față de ASB pot deveni toleranți la același antigen, dacă acesta se administrează zilnic în doze foarte mari (200 mg), timp de 3 săptămîni (tabelul 40).

4. IMUNOTOLERANȚA INDUSĂ PRIN COMPETIȚIE ANTIGENICĂ SPECIFICĂ

Inducerea imunotoleranței față de grefe de piele la șoareci adulți este posibilă și prin pretratamentul receptorilor cu doze mari de material specific de la șoarecii donatori de grefă (celule viabile, fragmente subcelulare) (571, 576, 577, 580, 607). Lipsa de răspuns imunologic la proteine și antigene polizaharidice s-a obținut de asemenea prin pretratament cu aceste antigene, realizîndu-se astfel o toleranță specifică față de antigenul-test (157, 219, 264, 366, 823). Teoria asupra inducerii imunotoleranței, bazată pe suprimarea clonelor specifice ale celulelor limfatice, consideră acest fenomen ca fiind fundamentul pentru înțelegerea stării de toleranță.

Prin competiție de antigene se înțelege depresiunea pronunțată a răspunsului imun al unui animal față de un anumit antigen, prin tratament cu doze mari dintr-un alt antigen imediat înaintea administrării antigenului ce urmează a fi tolerat (6, 7, 45, 154). Miller și colab. (621) au urmărit efectul competitiv al unor antigene asupra suprimării imunității de transplantare la șoareci. Ei au folosit următoarele 5 antigene fără legătură cu antigenele de transplantare: *Brucella abortus*, vaccin tifo-paratific, hemocianină, bacteriofag T_2 pentru *Escherichia coli* și polizaharid pneumococic de tip II. La un prim grup de animale, aceste antigene au fost injectate intraperitoneal, unul după celălalt, la interval de 6 ore. Animalele au fost sacrificate la 7 și 14 zile după ultima injecție de antigene. Răspunsul imun față de fiecare antigen din seria folosită a fost mult redus față de răspunsul care se obține prin administrarea lor separată. Competiția pare a fi fost mai pronunțată în faza precoce a răspunsului imun, scăzînd în intensitate după 14 zile, cînd titrul de anticorpi față de aceste

antigene creşte (în special faţă de primul antigen administrat) (tabelul 41). Animalelor dintr-un alt lot li s-au administrat celule splenice alogenice cu 12 ore înainte de injectarea celor 5 antigene. Celulele splenice au determinat

Tabelul 41

Testele serologice privind titrurile de anticorpi la 5 antigene (comparativ cîte o singură injecţie cu injecţiile simultane)*

Numărul zilelor după injectarea antigenelor	7		14	
Răspunsul în anticorpi	5 antigene împreună	Antigenul-test singur	5 antigene împreună	Antigenul-test singur
Antigene-test:				
Titrul aglutininelor în tub la antigen tific O *tus*	80	640	160	320
Titrul aglutininelor în tub la antigen tific H	0	160	160	320
Titrul aglutininelor în tub la antigen tific O	0	320	160	320
Metoda bacteriofagilor	0	++	0	+++
Precipitare în tub la hemocianină	0	+	0	+

* După Miller şi colab. (621).

scăderea răspunsului imun faţă de *Brucella abortus*, antigen tific O şi antigen tific H şi nu au influenţat răspunsul imun la bacteriofag şi hemocianină, ceea ce înseamnă că celulele limfatice alogenice au acţionat competitiv în acest sistem

Tabelul 42

Efectul celulelor alogenice şi singenice adăugate unui sistem competitiv de 5 antigene (antigen-test: *Brucella abortus*)*

Numărul zilelor după injectarea antigenelor	7	14
Titrul aglutinant în tub la *Brucella:*		
Brucella abortus singur	640	320
Antigene împreună	80	160
Celule singenice şi antigene	160	640
Celule alogenice şi antigene	40	80

* După Miller şi colab. (621).

(tabelul 42). Reciproc, competenţa imunologică a celulelor splenice la lotul de animale pretratate cu cele 5 antigene a fost redusă, fapt demonstrat prin testul Simonsen (816) privind reacţia grefă-contra-gazdă şi testul de interacţiune între grefă şi gazdă (622), considerate ca indicatoare ale imunităţii de transplantare.

Scanned with OKEN Scanner

Miller şi colab. (621) consideră aceste rezultate ca fiind importante din următoarele motive: a) ar putea reprezenta începutul aplicării practice a unei noi metode de imunosupresiune; b) ar putea contribui la înţelegerea naturii stimulului antigenic şi a dezvoltării toleranţei imunologice.

Este posibil ca această competiţie să aibă acelaşi mecanism ca şi competiţiile realizate cu diferite alte antigene netisulare (7, 45, 154). Competiţia antigenică poate fi privită ca un fenomen imunologic real care, în condiţiile experimentale favorabile, poate fi evidenţiat cu ajutorul unor tipuri diferite de antigene. Folosind un sistem competitiv asemănător cu acela al autorilor menţionaţi (603), Ferina şi colab. (citaţi de 603) au obţinut o toleranţă imunologică în cazul unei bariere slabe de histocompatibilitate, pentru grefe de piele între două linii genetice diferite de şoareci.

Aceste cercetări au deschis perspectiva reducerii reactivităţii imunologice şi, deci, a inducerii imunotoleranţei prin supradozare antigenică competitivă, utilizîndu-se antigen nespecific, nu antigene specifice, aşa cum s-a preconizat pînă nu de mult (571, 576, 581).

5. CONSIDERAŢII CLINICE

Procedeele folosite pînă acum în clinica umană pentru prelungirea supravieţuirii homografelor (iradierea, substanţele imunosupresoare) prezintă dezavantaje evidente. Ar fi de preferat, fără îndoială, ca receptorul să devină tolerant prin tratamente biologice. Este hazardat ca să se facă în prezent încercări de transpunere a rezultatelor privind imunotoleranţa, obţinute pe rozătoare şi cîini, la om; datele experimentale acumulate permit însă să se formuleze condiţiile optime pentru aplicarea viitoare a acestei metode în clinică: a) receptorul nu trebuie să fie sensibilizat la vreunul din antigenele grefei înainte de operaţie; b) donatorul de grefă trebuie să fie cît mai apropiat din punct de vedere genetic de receptor; imaginarea unui test eficace de tipizare a histocompatibilităţii, aplicabil la om, a devenit o necesitate urgentă; c) antigenul care induce imunotoleranţa trebuie să aibă următoarele proprietăţi: să poată fi obţinut în cantitate suficientă; să nu provoace o reacţie grefă-contra-gazdă; să conţină toate antigenele prezente în grefă şi absente la receptor; să fie preparat într-o formă care induce starea de imunotoleranţă, fără a avea însă capacitatea de a declanşa imunitatea de transplantare; să poată fi administrat pe cale intravenoasă, care s-a dovedit cea mai eficace.

Aceste deziderate exclud posibilitatea folosirii practice a celulelor vii pentru inducerea imunotoleranţei şi orientează cercetările spre obţinerea extractelor tisulare purificate şi concentrate. Un astfel de preparat ar fi un adjuvant important la terapia imunosupresoare actuală.

6. TOLERANŢA LA TRANSPLANTARE ÎN RELAŢIE CU IMATURITATEA IMUNOLOGICĂ ŞI CU VÎRSTA

Concepţia asupra naturii toleranţei imunologice faţă de ţesuturile transplantate a suferit diferite modificări în cursul celor 13 ani de cînd fenomenul a fost obţinut experimental pentru prima oară (74, 374). În prima etapă a

Scanned with OKEN Scanner

cercetărilor s-a considerat că starea de imunotoleranţă poate fi indusă numai la animalul nou-născut sau la făt, astfel încît fenomenul a fost legat de procesele de maturaţie imunologică. Faza iniţială de imaturitate imunologică, în care administrarea antigenului provoacă imunotoleranţă, nu şi imunizare, părea a fi urmată de o fază scurtă „neutră" şi apoi de starea caracteristică animalului adult, la care imunitatea poate fi provocată, dar nu şi imunotoleranţa (77, 79, 376).

S-a propus următoarea schemă a reacţiilor posibile:

Stadiul de dezvoltare a ţesuturilor prezumtiv imunologice	*Modalitatea caracteristică a răspunsului imunologic*
Faza adaptivă	Toleranţă
Perioada nulă sau neutră	Lipsă de reacţie
Maturitate	Imunitate

Pornind de la această premisă, a fost logic să se considere starea de toleranţă complet distinctă de „paralizia imunologică", termen propus de Felton (263) în 1949, pentru a descrie lipsa de răspuns specific la antigene polizaharidice de pneumococ, administrate în doze masive la şoareci adulţi. Diferenţa dintre cele două fenomene constă în aceea că toleranţa imunologică este efectul calitativ al antigenului *înaintea* maturării imunologice a animalului (fenomen de autorecunoaştere), pe cînd paralizia imunologică este efectul cantitativ al antigenului supradozat *după* maturaţia imunologică a animalului.

Imunotoleranţa s-ar baza pe o inhibare centrală a mecanismului de răspuns imunologic. Relativ recent, Medawar (606) a sugerat că şi paralizia imunologică s-ar realiza tot printr-o inhibare centrală. Ulterior, Howard şi colab. (417) au arătat că nu există o dependenţă specială între inducerea imunotoleranţei şi imaturitatea imunologică şi că însăşi concepţia despre imaturitate imunologică trebuie revizuită. Argumentele lor sînt: a) toleranţa la transplantare poate fi indusă ca şi paralizia imunologică chiar la animalele adulte şi b) capacitatea de imunizare caracteristică pentru definirea maturităţii imunologice poate fi obţinută prin procedee adecvate şi la animalele nou-născute care, supuse unui regim diferit de dozare a aceluiaşi antigen, pot să se imunizeze sau să devină tolerante. Reluînd aceste argumente, Michie şi Howard (617) au adus noi şi interesante date experimentale în sprijinul lor.

Mai mulţi autori au obţinut lipsă durabilă de răspuns specific faţă de homografa de piele la şoareci adulţi, supuşi administrării unei doze masive de celule vii purtătoare de antigene de la donator, fie prin injecţii masive şi repetate (805), fie printr-o unire parabiotică de cîteva săptămîni (580, 766), demonstrînd identitatea dintre această stare de lipsă de răspuns şi toleranţa imunologică. În cazul inducerii toleranţei faţă de antigenul specific de sex masculin a fost suficientă o singură injecţie de 20 milioane de celule (571). Dozele necesare pentru obţinerea imunotoleranţei la adult sînt mult mai mari decît cele necesare pentru inducerea ei la nou-născut şi cresc în raport cu creşterea vîrstei animalului, deci oarecum în raport cu greutatea sa corporală (101); acest fapt sugerează existenţa diferenţei între animalul adult şi animalul nou-născut în ceea ce priveşte mecanismul de inducere a imunotoleranţei, cu atît mai mult cu

Scanned with OKEN Scanner

cît cantitatea de țesut limfoid însăși crește disproporționat față de masa totală a animalului nou-născut sau foarte tînăr. Este mai normal să se asocieze doza mare de celule necesare inducerii toleranței, nu cu greutatea corporală a animalului, ci cu numărul de celule competente imunologic din centrii limfatici ai receptorului (număr foarte mare la animalul adult în comparație cu animalul nou-născut). Din acest punct de vedere, ușurința relativă a inducerii imunotoleranței la nou-născut s-ar putea explica ușor dacă stocul său de celule imunologic competente ar fi mai mic sau chiar absent. Menținerea în continuare a toleranței o dată induse ar necesita numai ca fiecare nouă generație de celule apărută prin proliferare să devină tolerantă la antigenul proaspăt, elaborat continuu de populația celulară a donatorului, adică a grefei. Șoarecele nou-născut de 1 g are aproximativ 4 000 000 celule splenice nucleate în comparație cu șoarecele adult de 20 g care are cam 150 000 000 celule splenice nucleate. Acest număr crește exploziv în primele zile care urmează după un contact al animalului adult cu un material antigenic (416). Perioada scurtă de proliferare intensă coincide cu aceea în care inducerea imunotoleranței diminuează rapid. Trebuie ținut seama de asemenea că splina la un animal nou-născut este predominant hematopoietică, deci numărul celulelor limfoide competente imunologic este fără îndoială foarte scăzut (629). Experiențele lui Michie și Howard (617) au demonstrat că șoarecele nou-născut este capabil să reacționeze față de antigenele celulelor donatorului și că același antigen administrat în doze mai mari induce toleranța. De altfel, ideea că fătul sau animalul nou-născut nu ar fi în stare de un răspuns imun s-a bazat, în special, pe lipsa de detectare cu ajutorul metodelor clasice a anticorpilor umorali după administrarea unui antigen. Privită strict din punctul de vedere al imunității „celulare", problema capătă un alt aspect. Astfel, fătul de oaie s-a dovedit competent imunologic, dat fiind că reacționează puternic la homografa de piele (781), iar hipersensibilitatea de tip întîrziat poate fi provocată destul de ușor la fătul de cobai (908) și la copil (910). La fătul de șoarece s-a obținut de asemenea inducerea hipersensibilității sau protecția față de bacilii Koch (744). De altfel, privit sub aspectul maturizării imunologice a animalului, răspunsul față de antigenele heterologe apare mai devreme decît la antigenele omologe (77). Autorii menționați (617) au reușit să obțină un răspuns diferențiat la șoarecele nou-născut în funcție de cantitatea de antigen administrată. Astfel, injectarea a 20 000 000 celule splenice adulte vii la un șoarece nou-născut duce la apariția unei reacții grefă-contra-gazdă foarte evidentă, datorită faptului că celulele injectate sînt competente imunologic, iar gazda este tolerantă. Splenomegalia caracteristică reacției grefă-contra-gazdă apare mai ușor și mai net dacă la naștere șoarecele nou-născut a fost injectat cu 20 000 000 celule neonatale de la un donator hibrid de tip F_1, celule care au antigene de transplantare, dar nu provoacă reacția grefă-contra-gazdă. Această administrare prealabilă de celule face gazda mai susceptibilă la declanșarea reacției grefă-contra-gazdă provocată printr-o a doua injecție (cu 48 de ore mai tîrziu), cu o doză masivă de celule splenice adulte. S-a observat că, dacă prima injecție de celule neonatale cuprinde o doză mai mică (200 000 în loc de 20 000 000 celule), se obține un răspuns inversat la 48 de ore după administrarea antigenului și anume, gazda, în loc să devină mai susceptibilă, devine mai rezistentă față de homografa celulară. Rezultatul se aseamănă for-

Scanned with OKEN Scanner

mal cu folosirea unui organism viu atenuat ca vaccin pentru protecţia faţă de tulpina virulentă. În termeni de vaccinare, doza de antigen în acest caz ar da o „antiprotecţie" şi fenomenul poate fi legat de paralizia imunologică a lui Felton (263, 264) obţinută la şoareci adulţi cu doze masive de antigen pneumococic care, administrate în doze mici, protejează animalele faţă de infecţia cu germeni vii. Acelaşi efect protector de „vaccinare" s-a obţinut şi prin folosirea unei suspensii de celule splenice iradiate letal în locul celulelor unui hibrid de tip F_1, deşi în acest caz doza a fost ceva mai mare. Faptele menţionate impun două concluzii, şi anume: a) şoarecele nou-născut conţine suficiente celule competente imunologic pentru a elabora un răspuns imun detectabil faţă de antigenul omolog de transplantare şi pentru a realiza o protecţie evidenţiabilă, în decurs de 48 de ore, faţă de celulele donatorului; b) în condiţii identice de testare, se poate obţine în acest interval de timp şi o stare de toleranţă, cu condiţia ca antigenul să fie administrat în doză suficient de mare.

Dacă se consideră aceste două tipuri de răspuns ca fenomene identice, condiţionate numai de modul de declanşare şi de doza de antigen, trebuie să se aibă în vedere şi următoarele obiecţii posibile: a) celulele competente imunologic ale gazdei ar putea fi complet înlocuite de celulele de la donator, aşa cum se întîmplă frecvent în himerele prin radiaţii; b) celulele imunologic competente ar putea să nu-şi exercite funcţia în mod obişnuit, ci într-o manieră protectoare faţă de grefă, de exemplu, prin producerea de anticorpi de facilitare; c) celulele competente imunologic ale gazdei ar putea fi făcute inerte sub efectul unor supradoze de antigen, funcţia imunologică a gazdei fiind depăşită de invazia masivă a celulelor de la donator. Aceste obiecţii par a fi fost înlăturate de Simonsen (815) care a demonstrat dobîndirea toleranţei specifice de către celulele limfoide adulte ale părinţilor, grefate la gazde hibride de tip F_1, la care au fost inoculate. Celulele donatorului par a primi toleranţa de la ţesuturile gazdei în răstimpul de 24 de ore de la inoculare, iar după această perioadă scurtă devin capabile să provoace efectul unui atac imun suficient de puternic pentru a declanşa la gazdă în 2—3 săptămîni o reacţie severă grefă-contra-gazdă. Cum rezultatele lui Simonsen (815) au fost de-a dreptul spectaculare, Howard şi colab. (417) au reluat problema inducerii toleranţei imunologice în funcţie de vîrsta animalului, cu intenţia de a verifica obiecţiile formulate mai sus.

a) **Analiza himerismului la şoareci A purtători de grefă.** Howard şi colab. (417) au reuşit să diminueze starea de lipsă de răspuns la şoareci adulţi din linia genetică A prin tratament cu o doză de raze Röntgen de 350 sau 500 r, urmat la 2—3 ore de injectarea a 500 milioane şi, respectiv, 1 200 milioane celule splenice recoltate de la donatori hibrizi de tip (A×CBA) F_1. S-au folosit donatori hibrizi pentru a se evita reacţia grefă-contra-gazdă, care apare foarte des cînd se folosesc şoareci de linie genetică pură (de exemplu, CBA). După 2—3 săptămîni, gazdelor tratate li s-au aplicat grefe de piele de la acelaşi donator, animalul hibrid (A×CBA) F_1. Rezultatele obţinute sînt rezumate în tabelul 43. Aceste rezultate au arătat că în majoritatea cazurilor a avut loc o înlocuire masivă a ţesuturilor limfatice ale gazdei cu ţesuturile donatorului. De la început s-a exclus presupunerea că reducerea activităţii imunologice a gazdei s-ar fi datorat unei sechele prin iradiere. Înlocuirea ţesuturilor limfatice ale

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 43

Acceptarea îndelungată a grefelor de piele de la şoareci (A×CBA)F_1 de către şoareci adulţi A după diferite tratamente *

Iradiere	Celule splenice de la şoarece (A×CBA)F_1	Intervalul înainte de grefa de piele (zile)	Proporţia grefelor care au supravieţuit peste 2 luni
500 r	—	21—35	0/19
500 r	$5-6\times10^8$	21—55	0/3
500 r	$7-8\times10^8$	18—46	5/7
500 r	12×10^8	21	8/8
350 r	8×10^8	17—37	0/3

* Ca un prim test de specificitate a reacţiei, la o parte din şoareci s-au efectuat grefe concomitente de piele de la şoareci C57BL. Aceste grefe au fost eliminate în 2 săptămîni, fără efect aparent asupra grefei acceptate, provenind de la şoareci (A×CBA)F_1. Următorul parametru a fost urmărirea prezenţei continue şi a activităţii celulelor limfatice proprii ale gazdelor care au acceptat grefe de piele. S-a folosit metoda testului splenic discriminant al lui Simonsen şi Jensen (817) [după Howard şi colab. (417)].

gazdei nu este însă totală şi ele nu sînt complet inactivate, deoarece în 3—4 cazuri activitatea lor a fost mult mai mare de zero în testul Simonsen-Jensen.

b) **Imunizarea prin adopţiune.** O altă posibilitate de interpretare a stării de lipsă de răspuns al şoarecilor adulţi faţă de grefa de piele ar fi apariţia fenomenului de facilitare, care a fost prezentat în amănunt în alt capitol.

Pentru a stabili dacă această stare reprezintă un fenomen de facilitare sau de toleranţă imunologică, Simonsen şi Jensen (817) au folosit testul imunităţii adoptive. În cazul fenomenului de facilitare, grefa nu este afectată de imunitatea prin adopţiune conferită de injectarea animalului cu celule limfatice izologe preimunizate faţă de pielea donatorului, pe cînd, în cazul toleranţei dobîndite, procedeul duce la eliminarea grefei de piele. Testul s-a executat pe şoareci A purtători de grefe de piele de la şoareci (A×CBA) F_1, în toate cazurile eliminarea grefei survenind după 6 săptămîni. Această durată nu este surprinzătoare, dat fiind că în această circumstanţă a fost necesar ca celulele limfatice preimunizate să acţioneze asupra unui animal cu himerism puternic şi nu numai asupra celulelor limfatice proprii ale gazdei. Deşi numărul experienţelor lui Simonsen şi Jensen (817) este mic, ele constituie argumente serioase în sprijinul ipotezei că în cazul menţionat nu intervine fenomenul de facilitare (417).

c) **Imunizarea şoarecilor nou-născuţi.** Cum toleranţa faţă de ţesuturile transplantate la animalele adulte se poate realiza prin administrare masivă de celule de la donator, se pare că doza de antigen este cea care decide asupra răspunsului: imunitate sau toleranţă. Dacă se admite „ipoteza cantitativă" în inducerea toleranţei înseamnă că prin reducerea dozelor de celule injectate se poate obţine imunizarea animalelor nou-născute în locul toleranţei lor. Rolul dozei a fost investigat prin inoculare la şoareci nou-născuţi din linii genetice pure a unui număr variabil de celule splenice normale, recoltate de la hibrizi de tip F_1 realizaţi între liniile genetice din care fac parte receptorul şi donatorul. După 2 zile, şoarecii au fost inoculaţi cu celule splenice de la donator într-o doză suficientă pentru a provoca reacţia grefă-contra-gazdă la şoarecii martori netrataţi. S-a presupus că administrarea neonatală a unei doze mari

Scanned with OKEN Scanner

de celule splenice ar putea induce toleranța și abroga rezistența animalelor față de a doua doză de celule, deci ar putea apărea reacția grefă-contra-gazdă. Prin contrast s-a presupus că administrarea neonatală a unor doze mici ar induce imunitatea, deci creșterea rezistenței față de al doilea inocul și nu ar permite apariția reacției grefă-contra-gazdă. Rezultatele experimentale au confirmat aceste ipoteze. Dozele mari provoacă imunotoleranță, iar semnele de rezistență dobîndită apar la doze mai mici, efectul fiind maxim la doza de 2×10^5 celule. Rezistență similară după al doilea inocul s-a obținut și prin injecții neonatale de celule splenice omologe iradiate cu 1 500 r, însă în acest caz doza folosită a fost mai mare (20—30 milioane). Examenul histologic al splinei recoltată după injectare de celule splenice imediat după naștere, a arătat modificări celulare asemănătoare celor găsite la animalele adulte după stimulare cu antigene puternice. Pe baza acestor date se poate afirma că diferența dintre toleranță și imunitate poate fi determinată, în cazul unor anumite limite antigenice, de o singură variabilă și anume de doza de antigen, fiind independentă de vîrsta animalului. Inducerea imunotoleranței ar putea deci fi ușurată de folosirea agenților care ar reduce cantitatea de celule limfatice ale gazdei. Această ipoteză explică efectul iradierii și al cortizonului ca agenți facilitanți și ridică problema practică de a se folosi în clinică agenți antilimfoizi, care să ușureze inducerea toleranței specifice pentru organele transplantate (417).

7. IMUNITATEA DE TRANSPLANTARE ȘI RELAȚIILE MATERNO-FETALE

Orice sarcină reprezintă o parabioză naturală și presupune o expunere intimă, reciprocă, a mamei și fătului la țesuturile fiecăruia și la antigene străine, antigene de transplantare. Fătul moștenește de la tată un număr variabil de antigene de transplantare care sînt străine de mamă și nu moștenește de la mamă toți factorii săi de histocompatibilitate. În timpul sarcinii există un schimb permanent sau repetat de homografe celulare între mamă și făt, deci relațiile materno-fetale pot constitui un model interesant de studiu al imunității de transplantare.

a) **Fătul ca homografă.** Existența sindroamelor hemolitice la nou-născut, sindroame care survin la om și unele specii domestice, este o dovadă evidentă a pericolului izoimunizării materne, provocată prin substanțe de grup sanguin ale fătului străine de antigenele materne, și se manifestă clinic prin distrugerea eritrocitelor acestuia în urma tarnsferului placentar al anticorpilor materni astfel generați. În anumite condiții experimentale, se pot institui relații imunogenetice între mamă și embrion cu totul asemănătoare acelora pe care le implică schimbul de homografe între doi indivizi neînrudiți genetic. O asemenea circumstanță se realizează prin transferarea unor ovule fertilizate unei femele neînrudită genetic cu indivizii fertilizanți. Acest tip de experiență s-a efectuat la iepuri de către Heape [citat de (70)], la șoareci (545), la șobolani (664), și viței (952) și la oi (30, 932), obținîndu-se nou-născuți normali, fără complicații imunologice aparente. Succesul, aparent inexplicabil, al comportării fătului ca o homografă este una dintre problemele majore nerezolvate ale imunității de transplantare.

Principalele ipoteze emise pentru explicarea fenomenului sînt următoarele:

Scanned with OKEN Scanner

Nematuritatea antigenică a fătului. Maturizarea relativ tîrzie a embrionului din punct de vedere antigenic a fost adusă, conform informațiilor furnizate de Billingham (70), ca o explicație pentru toleranța țesuturilor materne față de el, încă din anul 1924. Totuși, recent, s-a demonstrat că antigenele de transplantare apar foarte de timpuriu în viața embrionară. De exemplu, la păsări și șoareci, ele sînt prezente cu siguranță în a 12-a zi a vieții fetale și, poate, chiar mai înainte (87). Supraviețuirea îndelungată, deși nu indefinită, a homografelor de piele recoltate de la donatori în momentul perinatal, obținută la hamsteri și șoareci (87), nu se datorește unei lipse de antigene de transplantare în pielea respectivă, pentru că aceste grefe sînt capabile să inducă starea de sensibilizare. În acest caz, acceptarea prelungită a acestor grefe pare a se datori unei slăbiri a capacității de reacție a receptorului față de acest tip de antigene străine (87).

Sarcina și reactivitatea imunologică maternă. În timpul sarcinii, producția de hormoni adrenocorticali crește; or, se știe că sensibilitatea organismului față de homografe, ca și față de alte tipuri de antigene este deprimată de cortizon, ceea ce ar explica, în parte, rezistența scăzută a animalelor gestante și a femeii gravide la o serie de infecții. Pe această bază, Medawar (604) a sugerat că reactivitatea imunologică a mamei ar putea suferi modificări fiziologice, care ar proteja fătul împotriva pericolului de a-și imuniza mama. Alți autori (400) au demonstrat, direct, că homografele de piele plasate la iepuroaice în a 3-a săptămînă de gestație au o durată de supraviețuire de două ori mai mare decît homografele transplantate mai devreme sau mai tîrziu, în timpul sarcinii sau la femele care nu se află în gestație. Aceste fapte ar arăta că vîrful maxim al secreției de hormoni steroizi se află în perioada de sfîrșit a sarcinii. Pe de altă parte, însă, nici sarcina, nici tratamentul cu asemenea hormoni nu modifică la iepuri (400) nivelul sensibilității preexistente față de homografele de piele, iar la șoareci și bovidee, sarcina nu are un asemenea efect asupra dezvoltării sensibilității față de asemenea homografe (183, 608).

Uterul este un organ privilegiat imunologic? Se cunosc, așa cum s-a subliniat într-un capitol precedent, țesuturi și organe favorabile pentru grefe, în care acestea primesc cantitatea de sînge necesară și sînt aparent ferite de procesele imunologice de eliminare (creierul, camera anterioară a ochiului, bursa hamsterului sirian, testiculul și anumite țesuturi grase subcutanate). Factorul comun tuturor acestor țesuturi este lipsa unei căi fiziologice adecvate pentru provocarea răspunsului imun și anume, lipsa de dotare a grefei cu drenaj limfatic. Calea eferentă sanguină este însă bine reprezentată, astfel că homografele implantate în aceste organe sînt susceptibile de a induce sensibilizarea (cu excepția celor din camera anterioară a ochiului, unde homografa nu poate provoca sensibilizarea și nici nu poate fi influențată de o stare de sensibilizare preexistentă, deoarece nu se vascularizează). S-a emis ipoteza că un astfel de țesut privilegiat ar putea fi și uterul, ceea ce ar explica supraviețuirea fătului ca o homografă. Există însă numeroase argumente împotriva acestei ipoteze. O primă serie de argumente sînt de ordin clinic și se bazează pe investigația sarcinilor ectopice. În acest caz, țesuturi neuterine (salpinx, ileus, rect, peritoneu) pot fi locuri de implantare a oului fertilizat și, ulterior, locuri de dezvoltare a placentei embrionare. Fixarea oului în aceste locuri aberante nu pre-

Scanned with OKEN Scanner

judiciază dezvoltării normale a fătului o lungă perioadă de timp, care poate dura uneori pînă la termen. În cazul morții fătului plasat ectopic, nu s-a putut incrimina o reacție asemănătoare celei din homografă. Pe cale experimentală s-au produs la animale sarcini ectopice în cavitatea abdominală, cu dezvoltarea oului pînă la obținerea unui făt normal viabil (665). De asemenea, Kirby (469) a transferat blastocite sub capsulele renale la șoareci și a obținut embrioni normal dezvoltați. Schlesinger (782) a adus însă dovezile evidente că uterul nu posedă proprietăți imunologice speciale, care să-l facă un loc favorabil pentru implantarea embrionilor, diferiți genetic și antigenic. Acest autor a urmărit tumori specifice de genotip, implantate în coarnele uterine la șoareci și șobolani. Cînd tumoarea și femela-gazdă au avut aceeași constituție genetică, tumoarea s-a dezvoltat cu succes, pe cînd în cazul în care tumoarea s-a deosebit genetic de femela-gazdă dezvoltarea ei a fost numai tranzitorie. Mai mult chiar, tumorile omologe grefate în uter au fost distruse în mod accelerat de către femelele-gazdă presensibilizate specific, indiferent dacă în momentul grefării acestea au fost însărcinate, pseudoînsărcinate sau neînsărcinate.

Așadar, imunitatea de transplantare se manifestă la nivelul uterului în mod normal, la fel ca la orice alt țesut. Ceea ce protejează fătul împotriva sensibilizării lui prin antigenele mamei și mama împotriva capacității fătului de a o sensibiliza pare a fi un factor care depinde în primul rînd de constituția fătului.

Existența unei bariere fiziologice între mamă și făt. O caracteristică imunologică foarte evidentă a fătului este aparenta lui indiferență față de posibilitatea de sensibilizare maternă prin antigenele paterne moștenite de el. Această situație paradoxală frapează în special la acele specii de animale cu placentă, la care sîngele matern purtător de celule antigenice capabile de a distruge grefe, adică limfocite mici (88), este în contact direct și continuu cu trofoblastul fetal. S-au făcut nenumărate încercări de prejudiciere a sarcinilor heterospecifice (sarcini rezultate din încrucișarea unor animale diferite genetic), prin sensibilizarea mamelor cu homografe din genotipul tatălui, fie înainte de fecundare, fie în timpul sarcinii, la șoareci (382, 608, 625), șobolani (964) și iepuri (400, 964), dar nici una din experiențe nu a fost încununată de succes; toate sarcinile au fost duse la termen, iar fetii au fost viabili.

Transplantarea unui ou fecundat în prealabil în uterul unei femele din altă linie genetică nu influențează dezvoltarea sarcinii, nici în condiția presensibilizării femelei gestante prin grefe de piele de la cei doi părinți ai embrionului implantat, nici în condiția aplicării grefelor de piele în momentul transferului ovulului fecundat sau la mijlocul sarcinii (501). Aceste experiențe, care au dus la rezultate negative, sînt importante pentru că demonstrează, indirect, că eșecul sensibilizării materne nu trebuie atribuit originii materne a placentei (322). Pe de altă parte, s-a constatat că în componenta fetală a placentei se găsesc antigene paterne moștenite de făt (383). Recent, s-a susținut originea fetală a trofoblastului (96). Singura ipoteză plauzibilă este aceea conform căreia mama și fătul sînt complet separați printr-o barieră anatomică, în stare nu numai să prevină sensibilizarea mamei față de antigenele fetale de transplantare, ci să prevină și realizarea experimentală a unei sensibilizări. Se admite că factorul principal al acestei bariere este separarea completă a celor două

Scanned with OKEN Scanner

sisteme sanguine, matern şi fetal (604), deşi este evident că această explicaţie devine insuficientă, dacă se ţine seamă de suprafaţa mare prin care ţesuturile fetale şi materne vin în contact în placentă. Trofoblastul fetal formează o „frontieră" continuă şi fără întrerupere. La mamifere cu placente hemocoriale (om, iepure), numai un strat foarte subţire de trofoblast intervine între capilarele fetale şi sîngele matern din spaţiile intervilozitare.

Studiul corioepitelioamelor, derivatele maligne ale trofoblastului, a permis evidenţierea proprietăţilor imunologice speciale ale trofoblastului normal. Aceste tumori se metastazează pe cale venoasă şi cuprind foarte curînd numeroase ţesuturi şi organe. Creşterea lor rapidă devine interesantă, dacă este privită prin prisma faptului că ele nu sînt altceva decît homografe, dat fiind că au origine fetală. S-a încercat distrugerea corioepitelioamelor pe cale imunologică, prin administrare repetată de injecţii cu concentrate leucocitare şi prin aplicarea unor grefe de piele de la soţ (159, 221, 350, 755). Totuşi, rezultate certe de regresiune a metastazelor s-au obţinut numai într-un singur caz (159). La 2 bolnave s-a observat o diminuare a capacităţii de eliminare a grefei de piele de la soţ, în timp ce homografele de piele de la alţi donatori au fost eliminate în mod obişnuit (755). Potrivit observaţiilor lui Hachett şi Beech (350), coriocarcinoamele nu sînt antigenice şi au aceleaşi proprietăţi ca şi trofoblastul normal, care nu este antigenic. O serie de argumente clinice şi terapeutice (42, 398, 955), ca regresul metastazelor după ablaţia tumorii primare, succesul terapiei cu substanţe imunosupresoare de felul ametopterinei şi vincoleucoblastinei, permit să se conchidă că la o serie de bolnave se dezvoltă un oarecare grad de sensibilizare faţă de aceste tumori. În orice caz nu apar izoanticorpi serici faţă de grupele sanguine ale soţului (783). Femeile răspund cu atît mai bine la tratamentul chimioterapic, cu cît instituirea lui se face mai precoce (398), ceea ce demonstrează că anumite antigene slabe ale acestor tumori induc un grad de toleranţă de transplantare la gazda lor. Această toleranţă face ca răspunsul la tratament în fazele mai avansate ale bolii să fie mai slab.

Bazaţi pe analiza particularităţilor de histocompatibilitate a ţesutului placentar la şoareci în diferite stadii ale gestaţiei, Simons şi Russell (813) consideră că trofoblastul normal formează o barieră imunologică protectoare, un fel de tampon între mamă şi făt. Ei au urmărit grefe de piele, prelevate de la hibrizii de tip F_1, aplicate la receptori din linia genetică maternă. Porţiunea embrionară a fost izolată de trofoblast la un concept în vîrstă de 7 zile, aceste două componente fiind implantate separat sub capsula renală la receptori din linie genetică maternă, sensibilizaţi în prealabil cu antigene proprii liniei genetice paterne. În timp ce ţesuturile din porţiunea embrionară au fost distruse prompt, celulele din trofoblast au proliferat activ pînă la forma de celule gigante şi apariţia de spaţii sanguine tipice, supravieţuind la fel ca şi în cazul transplantării lor la gazde compatibile genetic. Trofoblastul s-a dovedit deci o sursă neeficace de antigene de transplantare. Acelaşi rezultat s-a obţinut şi prin transplantare de ovule fertilizate sau de blastocite sub capsula renală sau în splină (471, 813). În aceste cazuri, oul se dezvoltă sub forma unei tumori cu celule gigante trofoblastice, cu o supravieţuire de aproximativ 2 săptămîni la receptorii compatibili. Dacă oul de hibrid de tip F_1 este transplantat la gazde normale din linia genetică maternă, supravieţuirea lui nu este scurtată şi nu dă

Scanned with OKEN Scanner

naştere unei stări de sensibilizare faţă de antigenele liniei genetice paterne (grefe de piele). Kirby (470) a arătat că peste 25% din blastocitele de şoarece transplantate în capsula renală la şobolan produc un trofoblast activ, care invadează şi fagocitează ţesuturile din jur, comportîndu-se ca şi cum gazda ar fi de aceeaşi specie. Dacă, din contra, se transplantează un embrion de şoarece de 6—7 zile, lipsit de stratul său trofoblastic, reacţia este brutală şi embrionul eliminat în scurt timp.

Pînă în prezent nu se cunoaşte nimic despre lipsa de antigenicitate sau antigenicitatea foarte slabă a celulelor trofoblastului. Nu se ştie dacă se produc în acest ţesut antigene şi dacă acestea se eliberează. Singura celulă de mamifer cunoscută pînă acum ca fiind lipsită de antigene de transplantare este eritrocitul, această proprietate fiind asociată cu lipsa nucleului său. Cercetările asupra proprietăţilor celulelor trofoblastului sînt încă insuficiente. Folosirea corioepitelioamelor pentru a elucida problema antigenicităţii trofoblastului normal este neconcludentă din cauza rarităţii acestei tumori şi a faptului că ea se găseşte numai la om. Încercările de detectare a anticorpilor specifici de organ sau de ţesut faţă de placentă în timpul sarcinii au rămas, de asemenea, fără succes.

b) **Schimbul de homografe celulare între mamă şi făt şi consecinţele acestui schimb.** Se ştie astăzi că placenta normală nu constituie o barieră total impermeabilă pentru celule şi că în mod obişnuit are loc un oarecare schimb de celule între mamă şi făt, atît la om, cît şi probabil la alte mamifere. Primul transfer celular feto-matern semnalat a fost acela al eritrocitului, favorizat de sensibilizarea faţă de antigenul Rh. Folosindu-se diferite semne de „marcaj", s-a observat că trecerea hematiilor fetale în sîngele matern survine cam în 10—20% din sarcinile normale (181, 274, 512, 547, 974) în cantităţi variabile (0,1—3,0 ml sînge sau chiar mai mult). În cazuri de pletoră neonatală, cantitatea de sînge transferat este mult mai mare (23, 616). Pînă acum nu s-a dat o explicaţie faptului că este posibil numai schimbul de eritrocite, nu şi schimbul de leucocite; de asemenea nu se ştie exact cînd şi cum are loc acest schimb. Un alt exemplu de homografă de ţesut fetal este pătrunderea în mod invariabil, în curentul sanguin matern, a sinciţiotrofoblastului, ca un proces normal, începînd din a 18-a săptămînă de gestaţie (96, 225, 771). Se cunosc foarte puţine lucruri despre aceste fragmente de trofoblast şi anume că nu proliferează (688) şi că, fiind foarte susceptibile la acţiunea enzimelor proteolitice, *in vitro*, sînt probabil distruse rapid *in vivo* (225). Nu trebuie totuşi să se excludă posibilitatea ca ele să exercite un schimb slab antigenic. Nu se cunoaşte decît la om existenţa acestui transfer de trofoblaşti (688). Dacă se interpretează aceste schimburi de celule materno-fetale ca homografe celulare, trebuie să se excludă de la început eritrocitele, dat fiind că ele nu conţin antigene de transplantare.

Influenţa trecerii celulelor fetale la mamă. Înainte de a se discuta consecinţele trecerii celulelor fetale la mamă, trebuie să se admită că ipoteza — conform căreia numai animalele foarte tinere pot deveni tolerante, ca urmare a inoculării unor celule vii, homologe — nu mai poate fi susţinută (87). Astăzi este bine stabilit că administrarea unor doze adecvate de antigen poate da o toleranţă de transplantare specifică la orice vîrstă, diferenţa constînd în cantitatea de antigen necesară şi în modul de administrare a acestuia. Determinarea

Scanned with OKEN Scanner

toleranței se realizează mai greu la gazde mature sau la gazde la care disparitatea genetică dintre donator și receptor este mai mare. Se pune, deci, problema dacă la femele se dezvoltă o sensibilizare față de masculul cu care au avut mai multe sarcini. Medawar și Sparrow (608) nu au găsit dezvoltarea sensibilității la șoricioaice CBA încrucișate repetat cu șoareci A. Pe de altă parte, însă s-a observat că dacă împerecherile au avut loc între femele A și masculi CBA, după sarcini repetate, este posibilă prelungirea supraviețuirii grefelor de piele CBA la femelele A, dar s-a demonstrat ulterior că prelungirea acestei supraviețuiri are altă cauză. Breyere și Barrett (107, 108) au făcut experiențe asemănătoare cu șoareci DBA/2 și Balb/c, care se deosebesc între ei prin 13 factori de histocompatibilitate, fiind însă identici în privința *locus*-ului H-2. Ei au confirmat faptul că încrucișarea heterospecifică nu duce la sensibilizarea acestor animale și au stabilit că se poate obține modalitatea inversă de răspuns, adică o slăbire specifică a reactivității față de homografa de piele de la animale din linia genetică a părintelui. Capacitatea șoarecilor Balb/c de a elimina pielea sau homografe tumorale de la donatori DBA/2 diminuează progresiv prin încrucișarea repetată a femelelor Balb/c cu masculi DBA/2. Mai mult chiar, o sensibilizare preexistentă poate fi slăbită prin sarcini heterospecifice. Testul homografei tumorale este mai sensibil decît acela al homografei de piele, deoarece prin el se pot depista grade mai mici de sensibilizare. Astfel s-a putut constata că dacă se încrucișează șoareci C3H cu femele Balb/c (între aceste animale existînd histocompatibilitate la nivel de *locus* H-2), după sarcini repetate se realizează la femelele respective abrogarea rezistenței normale față de celule tumorale provenind de la șoareci C3H (109). În cazul combinației de masculi DBA/2 cu femele Balb/c s-a demonstrat că antigenele responsabile de inducerea imunotoleranței la mamă (evidențiată prin prelungirea supraviețuirii la mamă a unei grefe de piele de la tată) ține de făt și se produce înainte de nașterea acestuia (110). Un alt exemplu de histocompatibilitate la nivelul cromozomului Y a fost furnizat de încrucișarea dintre mascul BL/6 și femelă C57. În acest caz s-a observat că, după sarcini repetate, femela prezintă o toleranță crescută față de grefa de piele de la mascul (722), ceea ce înseamnă că materialul antigenic Y, prezent în spermatozoid, trebuie să părăsească într-un fel tractul genital al femelei și să ajungă la țesuturile materne.

Asupra mecanismului toleranței de transplantare, foarte specifică, indusă prin sarcină, se cunosc pînă acum foarte puține date. Deși nu pare a fi o manifestare a fenomenului imunologic de facilitare, despre care s-a amintit anterior (454), totuși, această posibilitate nu poate fi exclusă, deoarece în cazul încrucișării animalelor anumitor linii genetice sarcinile repetate heterospecifice la șoricioaice (399) și la șobolance (70) duc la apariția anticorpilor umorali. La șoareci, această toleranță pare a rezulta ca urmare a administrării repetate de antigene celulare în doze mici. Este de presupus, deci, că la mamifere cu perioadă de gestație mai lungă se pot obține rezultate mai importante. De asemenea, s-a arătat că sarcinile repetate pot să scadă reactivitatea femeilor față de antigenele de transplantare ale soților lor, fapt care s-ar putea testa prin injectarea intradermică de limfocite materne la soț [testul realizat de Brent și Medawar (105) la cobai]. Toleranța maternă poate fi cu greu considerată ca un mecanism natural de protecție contra riscului de sensibilizare în timpul sarcinii, deoarece nu apare în perioada timpurie a sarcinii și nu se manifestă față

Scanned with OKEN Scanner

de antigene puternice de transplantare; de altfel, faptele experimentale infirmă net o astfel de ipoteză. Se știe că este nevoie de cantități mari de celule vii omologe care, injectate intravenos la șoarecele adult, să inducă toleranța față de grefa de piele chiar la animale la care diferența genetică nu este mare (87), astfel că este greu de admis ca influența sarcinilor repetate să fie importantă, dat fiind că celulele care ajung în curentul sanguin matern sînt în număr mic. În cazul imunotoleranței induse prin sarcini repetate, explicația fenomenului ar consta din faptul că femela gestantă este expusă la un transfer intravenos cronic și, deci, permanent, de cantități mici de antigene de la mascul, prin intermediul fătului, ceea ce realizează o scădere a capacității ei de răspuns față de homografele tisulare de la masculul respectiv. Acest mod de inducere a unui grad de imunotoleranță, prin cantități mici și îndelung repetate de antigene, s-a mai realizat experimental la iepuri prin injecții intravenoase de celule epidermice sau leucocite (89) și la șobolani și șoareci prin homografe prealabile de țesuturi endocrine, pe care erau incapabili să le elimine (530).

Influența trecerii celulelor materne la făt. Dacă celulele materne, în special leucocite, ajung timpuriu și în cantitate suficient de mare în circulația fătului, este posibil să inducă la făt un grad de toleranță față de antigenele de transplantare străine ale mamei. S-a încercat inducerea acestui tip de imunotoleranță la animale de laborator: șoareci, cobai, iepuri, bovidee (79, 439, 540), dar gradul de toleranță obținut în ansamblu este destul de slab. La om, Peer (695, 696) susține că uneori copiii acceptă homografe de piele de la mamă pentru o perioadă de timp egală cu aceea din cazul în care grefa este luată de la tată și că, în rare cazuri, mama acceptă pentru o perioadă de timp relativ lungă grefa de piele de la copilul său.

Trecerea celulelor maligne la făt. În cazul infiltrării fătului cu celule normale materne, detectarea lor nu se poate face pînă cînd nu apar consecințele imunologice, ca inducerea imunotoleranței sau apariția reacției grefă-contra-gazdă. În cazul că infiltrarea se face cu celule maligne, observarea consecințelor se poate face mai repede. Numai în foarte rare cazuri, celulele canceroase prezente în curentul sanguin matern sau în metastazele uterine la femelele gestante se regăsesc în stadiu deschis de proliferare la făt (751, 938). De asemenea sînt foarte rare cazurile de transmitere materno-fetală a neoplasmelor maligne hematopoietice (216). Se cunosc în literatură 5 cazuri, în care celulele tumorale melanofore au trecut bariera placentară și au dat tumori în țesuturile copilului (79). În aceste cazuri, probabil, că celulele tumorale au trecut la făt și au format depozite tumorale apreciabile înaintea apariției competenței lui imunologice. Recent s-a arătat pe baze histologice că fătul uman este capabil să răspundă imunologic la infecții cu sifilis și toxoplasmă, începînd din luna a 6-a și, poate, chiar mai devreme (811). Deci, capacitatea de a distruge celule omologe materne se dezvoltă la o vîrstă foarte timpurie. Acest fapt ar putea explica raritatea cazurilor de transplantare neoplazică.

8. CONDIȚIONAREA GREFEI

S-a amintit la începutul acestui capitol că, teoretic, inducerea imunotoleranței s-ar putea realiza fie prin scăderea capacității de reacție imunologică a gazdei receptoare, fie prin condiționarea grefei, în așa fel încît să declanșeze

Scanned with OKEN Scanner

o reacție minimă sau să nu declanșeze nici o reacție în organismul receptor. S-a arătat că majoritatea încercărilor s-au îndreptat în direcția condiționării receptorului. Trebuie semnalate și încercările de condiționare a grefei care, deși au fost mai puțin numeroase, au permis totuși stabilirea unor observații interesante.

a) **Reducerea antigenicității grefei.** S-au încercat mai multe metode de obținere a unor grefe cu antigenicitate scăzută. Astfel, s-au selecționat ca donatori animale imature din punct de vedere imunologic (761, 881, 895). S-a încercat de asemenea iradierea grefei înaintea transplantării ei (215), dar rezultatele au fost îndoielnice, deoarece pe lîngă faptul că scade antigenicitatea grefei, iradierea reduce în același timp viabilitatea ei, iar grefa de obicei moare. S-a urmărit micșorarea sau modificarea antigenicității grefei și, prin menținerea ei, o durată mai scurtă sau mai lungă în culturi de țesuturi înainte de transplantare. Efectele acestui procedeu sînt însă nespecifice, obținîndu-se o reducere a activității metabolice a grefei, concomitent cu o alterare a viabilității ei. Este posibil ca în condițiile relativ nefavorabile ale culturii de țesuturi să apară unele clone celulare mai viguroase, care să aibă mai multe șanse de supraviețuire în condițiile nefavorabile oferite de viitorul receptor al transplantului. Gaillard (291) a obținut o alterare specifică a grefei umane de paratiroidă, prin menținerea ei în cultură timp de 2—3 săptămîni înainte de transplantare și prin adăugarea unor cantități crescînde din serul viitorului receptor la mediul de cultură. Prin acest procedeu el a urmărit să „obișnuiască" grefa cu mediul receptorului sau să modifice sinteza proteinelor celulelor grefei în sensul de a le face mai asemănătoare celulelor gazdei.

b) **Adaptarea.** Teoretic, o grefă s-ar putea adapta singură la un mediu ostil, asigurîndu-și astfel o supraviețuire prelungită. Supraviețuirea unei grefe dincolo de perioada obișnuită de timp s-ar putea realiza prin însușirea de către grefă a proprietăților gazdei și ar reprezenta, în acest caz, o adevărată adaptare a grefei respective la receptor. Simpla însușire a proprietăților imunologice ale receptorului este insuficientă, însă, dacă nu se însoțește și de o pierdere a proprietăților specifice ale grefei.

O altă posibilitate ar putea fi realizată nu prin pierderea proprietăților specifice ale grefei, ci numai prin blocarea lor, ceea ce ar antrena tolerarea grefei de către receptor (965). Prin retransplantarea grefei de la receptor la donator se poate verifica dacă proprietățile gazdei receptoare au fost sau nu transferate la grefă. Dacă grefa este reacceptată de donatorul inițial, înseamnă că proprietățile sale, achiziționate recent de la receptorul la care a fost transplantată, sînt de mică importanță. Dacă, din contra, retransplantarea grefei la donator este urmată de eliminarea ei, faptul confirmă că grefa s-a adaptat receptorului și și-a modificat fundamental proprietățile. Acest fenomen a fost realizat pe pui de găină (145). O serie de studii efectuate cu indicatori adecvați (de exemplu, cromatina sexuală) au arătat că în acest caz intervine un veritabil fenomen de adaptare și nu de o înlocuire treptată a țesuturilor grefei cu țesuturile gazdei.

O altă dovadă a adaptării este faptul că o primă grefă poate fi tolerată de receptor, în timp ce o a doua grefă de la același donator este eliminată (145).

Scanned with OKEN Scanner

c) **Transformarea.** Dacă ţesuturile grefate ar putea fi transformate astfel încît să nu dea naştere unei reacţii imunologice din partea receptorului, problema homotransplantării ar fi rezolvată. În acest sens s-au făcut o serie de încercări de modificare sau scădere a efectelor antigenelor de transplantare. O observaţie sugestivă asupra posibilităţii transformării celulelor a fost făcută de Mannick şi Egdahl (562). Celule limfoide de la iepuri sensibilizaţi specific (A), injectate intradermic la iepurii faţă de care au fost sensibilizaţi (B), dau naştere la aceştia din urmă la o reacţie tegumentară, o adevărată reacţie de transfer. Celulele limfatice ale unui al treilea animal (C), indiferent, în mod normal nu dau nici o reacţie cutanată, dacă sînt injectate intradermic la animalul (B). Dacă sînt incubate însă în prealabil cu ARN pur, extras din celulele limfatice sensibilizate ale animalului iniţial (A) şi apoi sînt injectate la iepurii (B), ele provoacă o reacţie tipică cutanată. Celulele limfatice ale celui de-al treilea animal (C) au „învăţat" să formeze anticorpi faţă de iepurii (B), deşi nu au venit niciodată în contact cu antigenele acestor iepuri (B).

d) **Translocarea.** Prin translocare se înţelege transferul unui fragment cromozomial de la un cromozom la altul în timpul diviziunii celulare. Translocarea poate avea loc şi reciproc, între diferiţi cromozomi. Dacă transferul survine în timpul meiozei, fătul rezultat nu va fi alterat, deoarece va dispune de *loci* într-o dispoziţie anormală. Celulele gonadale ale progeniturii vor putea da naştere însă la descendenţi anormali din cauza aranjamentului anormal al *loci*-lor, putînd exista la aceste animale celule ovariene sau spermatice cu *loci* translocaţi. Translocarea poate surveni spontan sau poate fi indusă prin iradiere, cu agenţi mutageni sau agenţi distrugători (826). Dacă în ţesuturile somatice care urmează a fi transplantate s-ar putea induce unele translocări, obţinîndu-se astfel o condiţionare a grefei, metoda ar fi de cea mai mare importanţă teoretică şi practică. Din păcate, sub acest aspect lucrurile sînt deocamdată numai de domeniul ipotezelor. Totuşi, translocări cromozomiale s-au obţinut în cursul experienţelor privind biologia transplantului efectuate de către Hauschka şi Holdridge (387). Ei au obţinut translocarea unei porţiuni din cromozomul Y, care avea un *locus* H la un autozom. Progenitura femelă, rezultată din părintele cu această translocare, a avut acea porţiune cromozomială care elaborează antigen specific de sex masculin, a acceptat homografe de piele de la masculi fără să le elimine. În schimb, grefele de piele de la aceste femele translocate, aplicate la alte femele normale, izogenice, au fost eliminate. Un alt exemplu de translocare poate fi găsit în lucrările lui Cattanoch (149). El a translocat un fragment cromozomial purtător al unui grup de legătură I (*loci* H-1, H-4 şi cîteva gene pentru culoarea blănii) pe cromozomul X. Descendenţii rezultaţi au fost purtători de cromozomi X obişnuiţi şi de cromozomi X translocaţi, sub forma unui mozaic împărţit pe diferite părţi ale corpului: o parte a corpului a avut cromozom X obişnuit, activ, cealaltă cromozom X translocat, activ, şi, în funcţie de această variaţie, a variat culoarea părului, ca şi histocompatibilitatea diverselor porţiuni ale tegumentului său.

Scanned with OKEN Scanner

O serie de cercetări experimentale au urmărit să pună în evidență durata imunotoleranței stabilite și mecanismele prin care ea poate fi suprimată. Rezultatele au demonstrat că folosind metodele de inducere a toleranței imunologice se poate obține în anumite condiții un rezultat invers, adică suprimarea ei.

Folosirea celulelor în abrogarea toleranței. Injectarea celulelor limfatice omologe izolate la șoareci făcuți toleranți față de linia genetică a donatorului de celule duce la dispariția toleranței dobîndite. Rezultatele nu sînt însă totdeauna pozitive, iar numărul de celule care trebuie injectat este foarte mare. În general, suprimarea toleranței prin imunitate de adopțiune se realizează destul de greu, fenomen care se poate ilustra concludent prin exemplul toleranței induse față de antigenul specific de sex masculin; Billingham și Silvers (85) au arătat că un amestec de celule limfatice, recoltate de la mai multe femele nesensibilizate izologe, nu este eficient în suprimarea imunotoleranței dacă, în prealabil, la inducerea ei s-a folosit un singur donator pentru un receptor.

Iradieri subletale. Nossal și colab. (670) au stabilit că iradierea subletală a șoarecelui tolerant determină suprimarea toleranței față de diferite antigene (celule și extracte solubile). Pentru explicarea fenomenului, autorii au emis trei ipoteze:

Animalul tolerant conține un amestec de celule proprii și celule de la donator. O parte din celulele proprii sînt însă imunizate față de antigenele grefei, deci, practic, sînt inhibate, mecanismul acestei inhibiții fiind încă necunoscut. Iradierea ar omorî celulele proliferante ale donatorului și celulele tolerante ale receptorului, dar nu și celulele imune radiorezistente. În consecință, ele ar fi eliberate din starea de inhibiție și ar putea reacționa. Iradierea ar putea induce fie formarea unor celule mutante care, la rîndul lor, ar forma clone reactive față de antigenele donatorului, fie distrugerea celulelor donatorului care ar duce la diluarea antigenului și la formarea anticorpilor.

Folosirea fragmentelor subcelulare. Injectarea antigenelor eritrocitare la șoarece provoacă formarea de aglutinine. Feldman și colab. (260) au arătat că se poate induce farmacologic o toleranță temporară față de antigene eritrocitare heterologe, care poate fi abrogată prin injectarea de eritrocite izologe, generatoare de aglutinine în ser, ca urmare a stimulului antigenic. Răspunsul se poate obține și prin injectarea unor fragmente subcelulare bogate în ADN. Adaosul de ADN-ază abolește reactivitatea, în timp ce adaosul de ARN-ază nu are efect.

B. INDUCEREA ARTIFICIALĂ A IMUNOTOLERANȚEI

I. *INDUCEREA FARMACODINAMICĂ A IMUNOTOLERANȚEI*

În cursul ultimilor 10—15 ani au fost efectuate numeroase lucrări, în scopul suprimării artificiale a reacțiilor imunologice. Recrudescența interesului actual asupra acestei probleme se datorește, după Schwartz și André (791), următorilor factori: a) însușirea principiului fundamental, potrivit căruia formarea anticorpilor, indiferent de manifestările particulare ale unui anumit anticorp, este rezul-

tatul proliferării celulare; b) o mai bună înţelegere a procesului imun, în special a reacţiei faţă de homotransplantul de organe sau ţesuturi; c) descoperirea unor agenţi chimici (de felul 6-MP şi aminopterinei) sau biologici (de felul actinomicinelor), care sînt inhibitori puternici ai creşterii celulare; d) introducerea unor metode perfecţionate în cercetarea producerii anticorpilor, incluzînd folosirea izotopilor şi a culturilor de ţesuturi; e) ideea că folosirea unor agenţi chimici şi biologici, separat sau în asociere, ar putea fi o soluţie practică a problemei homotransplantării organelor şi ţesuturilor şi a altor tulburări imunologice la om.

Ca urmare, substanţele imunosupresoare, alături de iradiaţie, au fost folosite pe o scară largă, în scopuri experimentale şi clinice, în transplantarea organelor şi ţesuturilor (136, 424, 615, 642, 643, 844, 977, 979, 983, 986), chiar înainte de a se elucida complet modul lor de acţiune. Mai mult, în ultimii cîţiva ani, substanţele imunosupresoare au înlocuit într-o mare măsură tratamentul prin iradiere totală a organismelor purtătoare ale unui organ homotransplantat (362, 424, 492, 641, 690, 717, 779, 842, 969). Schimbarea de atitudine terapeutică s-a petrecut în momente diferite şi centre diferite, în funcţie de o serie întreagă de condiţii particulare fiecărui centru de cercetări în domeniul transplantării organelor (de exemplu, în funcţie de raportul dintre donatori în viaţă şi cadavre-donatori, folosiţi în funcţie de metodele de selecţionare a donatorilor sau în funcţie de posibilităţile materiale de tratament). În linii generale, metodele de tratament curent utilizate acum în aceste centre sînt în mod remarcabil asemănătoare.

Mecanismele de acţiune a substanţelor imunosupresoare. Se pare, aşa cum se va arăta în amănunt la momentul respectiv, că aceste substanţe produc blocade chimice ale unor funcţii specifice, însă corelaţia acestor reacţii cu efectul biologic încă nu se poate face (11, 645). Pe baza evidenţei acumulate pînă în prezent se consideră, în mod teoretic, că substanţele imunosupresoare clasificate ca antimetaboliţi intră în competiţie cu purinele şi pirimidinele naturale în sinteza acizilor nucleici şi determină astfel producerea unor anticorpi anormali, ineficienţi funcţional, că actinomicinele şi altele antibiotice blochează controlul ADN asupra sintezei ARN, în timp ce corticosteroizii acţionează în etapa finală a reacţiei imunologice, împiedicînd formarea complexului antigen-anticorp şi distrugînd limfocitele (21, 409, 800). Aşadar, substanţele imunosupresoare inhibează toate etapele reacţiei faţă de homografă, întîrziindu-i declanşarea şi desfăşurarea, reducîndu-i intensitatea şi diminuînd proliferarea celulară în ganglionii limfatici care drenează regiunea homografei. Unele dintre căile posibile prin care aceste substanţe suprimă răspunsul imun la homografă vor fi prezentate în amănunt, dar trebuie să se aibă în vedere că lipsa unor cunoştinţe profunde asupra modului în care răspunsul imun însuşi este iniţiat şi împlinit face dificilă înţelegerea totală a rolului jucat de unele dintre ele (61). În general se poate afirma, pe baza cunoştinţelor actuale, că modalităţile de acţiune a substanţelor imunosupresoare sînt: inhibiţia captării de antigen, demonstrată numai în cazul hormonilor steroizi, inhibiţia mitozelor, inhibiţia sintezei ARN, a ADN şi a proteinelor, alterarea bazelor sintetizante ale acizilor nucleici şi distrugerea celulară.

Reducerea frecvenţei mitozelor. Acest efect a fost observat în numeroase ţesuturi după administrarea celor mai multe dintre substanţele imunosupresoare

Scanned with OKEN Scanner

și poate explica capacitatea lor de a inhiba proliferarea celulelor limfoide provocată de prezența grefei. În unele circumstanțe, inhibiția mitotică se poate datori insuficienței sintezei ADN; în alte circumstanțe, agenții imunosupresori au acțiune primară asupra mitozei, așa cum se întîmplă în cazul unor doze de radiații sau agenți alchilanți, care inhibează mitozele, dar au efect redus sau nu au nici un efect asupra sintezei ADN (461, 523).

Inhibiția sintezei ADN, a ARN și a proteinelor. Această acțiune este comună majorității agenților imunosupresori (fig. 87). Informații amănunțite asupra acestor probleme au publicat Greenberg (335), Hochster și Quastel (410) și Brockman (112). Trebuie avut în vedere că o bună parte din evidența experimentală asupra inhibiției sintezei ADN, a ARN și a proteinelor de către agenții imunosupresori se referă la sisteme *in vitro* și că unele mecanisme, foarte importante pentru această condiție experimentală, pot fi mai puțin importante sau chiar neoperative *in vivo* (55).

Antimetaboliții inhibează reacțiile biochimice intrînd în competiție cu metaboliții naturali pentru funcțiile enzimatice respective. Cînd afinitățile metabolitului și antagonistului său pentru enzimă sînt de același ordin, excesul de metabolit poate reduce sau anula inhibiția. În alte cazuri, combinația enzimei și a antimetabolitului poate fi practic ireversibilă, cum se întîmplă în cazul metotrexatului, a cărui afinitate pentru reductaza folică este de 20 000 de ori mai mare decît a metabolitului natural (940).

Enzima care mediază veriga inițială a unui lanț de sinteze secvențiale poate fi inhibată de asemenea de către produsul final al lanțului, iar unii dintre antimetaboliți imită metaboliții naturali în realizarea inhibiției, printr-un mecanism similar de *feed back*. De exemplu, 6-tioguanina și 6-MP, cînd se convertesc *in vivo* în ribonucleotidele corespunzătoare, mimează acțiunea inhibitoare a ribonucleotidelor purinice naturale asupra etapei inițiale, ireversibile, a sintezei purinice, adică asupra conversiunii fosforibozilpirofosfatului în fosforibozilamină (595, 973).

Radiațiile, agenții alchilanți și antibioticele acționează asupra stadiilor finale ale sintezei de acizi nucleici și asupra asamblării moleculei proteice (61).

Alterarea bazelor sintetizante ale acizilor nucleici. Unii dintre antimetaboliți mimează metaboliții naturali într-o asemenea măsură, încît îi înlocuiesc total în căile metabolice de sinteză a acizilor nucleici, inclusiv în formarea moleculelor active ale acestora. Printre acești antimetaboliți se află 6-tioguanina, 5-fluorouracilul, 5-bromouracilul și 5-iododezoxiuridina (113, 135, 516). Nu există date care să ateste că 6-MP este încorporată în același mod (61). Cantități surprinzătoare dintr-o bază naturală (chiar 50%) pot fi înlocuite prin analogi, fără afectarea evidentă a viabilității celulare, așa cum s-a putut demonstra, cel puțin, în culturi de țesuturi (220). În bacterii, înlocuirea ARN-uracilului cu fluorouracil duce la modificări ale compoziției aminoacizilor și ale proprietăților fizico-chimice ale proteinelor în constituția cărora intră (653, 654). Prin urmare devine plauzibilă posibilitatea ca, în celulele competente imunologic în care ARN a fost alterat prin incorporarea unor „baze frauduloase" sau a fost incorect sintetizat pe seama ADN-templatelor conținătoare ale unor asemenea baze, să se producă modificări funcționale similare, avînd ca rezultat producerea unor anticorpi cu capacitate limitată de combinație sau cu anomalii de specificitate.

Scanned with OKEN Scanner

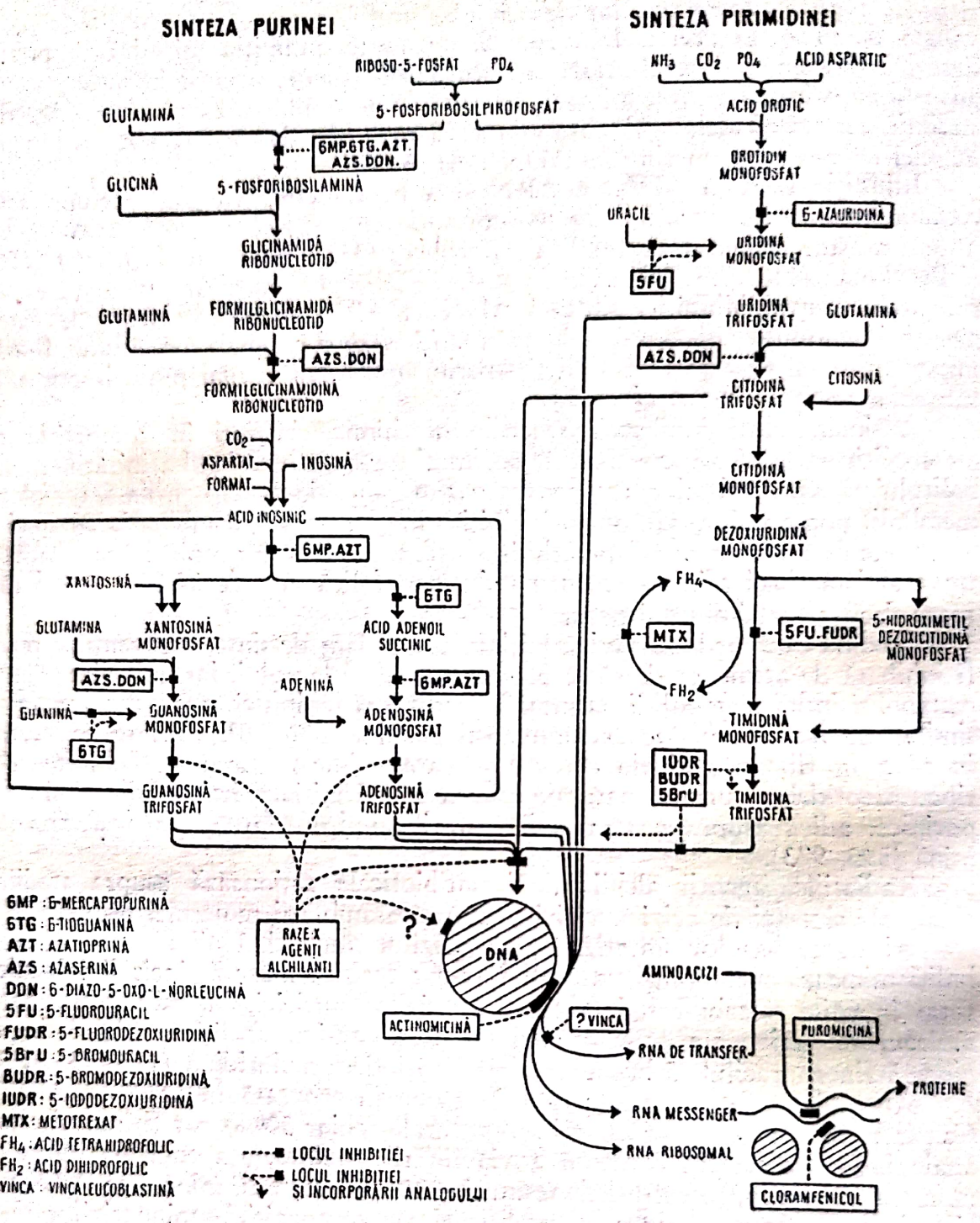


Fig. 87. — Schema căilor principale de sinteză a acidului dezoxiribonucleic (DNA), a acidului ribonucleic (RNA) și a proteinelor și etapele în care acționează substanțele imunosupresoare [după Berenbaum (61)].

Distrugerile celulare. Simpla inhibiție a proliferării celulare nu poate fi făcută responsabilă de toate efectele substanțelor imunosupresoare, multe dintre acestea determinînd distrugeri celulare evidente histologic. În asemenea cazuri,

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 88. — Homotransplant renal canin care a funcţionat 17 zile sub tratament cu 6-(2,4-dinitrofenil)-tiopurină.

Se poate vedea necroza fibrinoidă în peretele unei arteriole aferente (hematoxilină-eozină, × 600) [după Porter şi colab. (716)].

Fig. 88

Fig. 89. — Biopsia unui rinichi uman la 7 luni după transplantare.

A — un glomerul tipic cu proliferare celulară endocapilară şi hialinoza moderată (× 570); *B* — imagine electronooptică a aceluiaşi rinichi în care se observă proliferarea celulelor endocapilare, depozite hialine subendoteliale şi intercelulare, obliterarea parţială a lumenului capilar şi leziuni moderate ale celulelor epiteliale (× 14 000) [după Hamburger şi colab. (361)].

Fig. 89 A

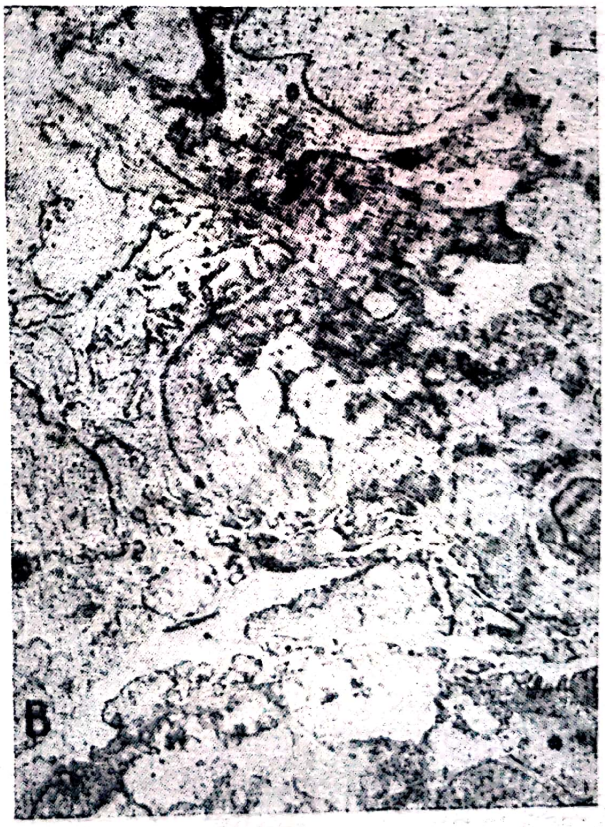


Fig. 89 B

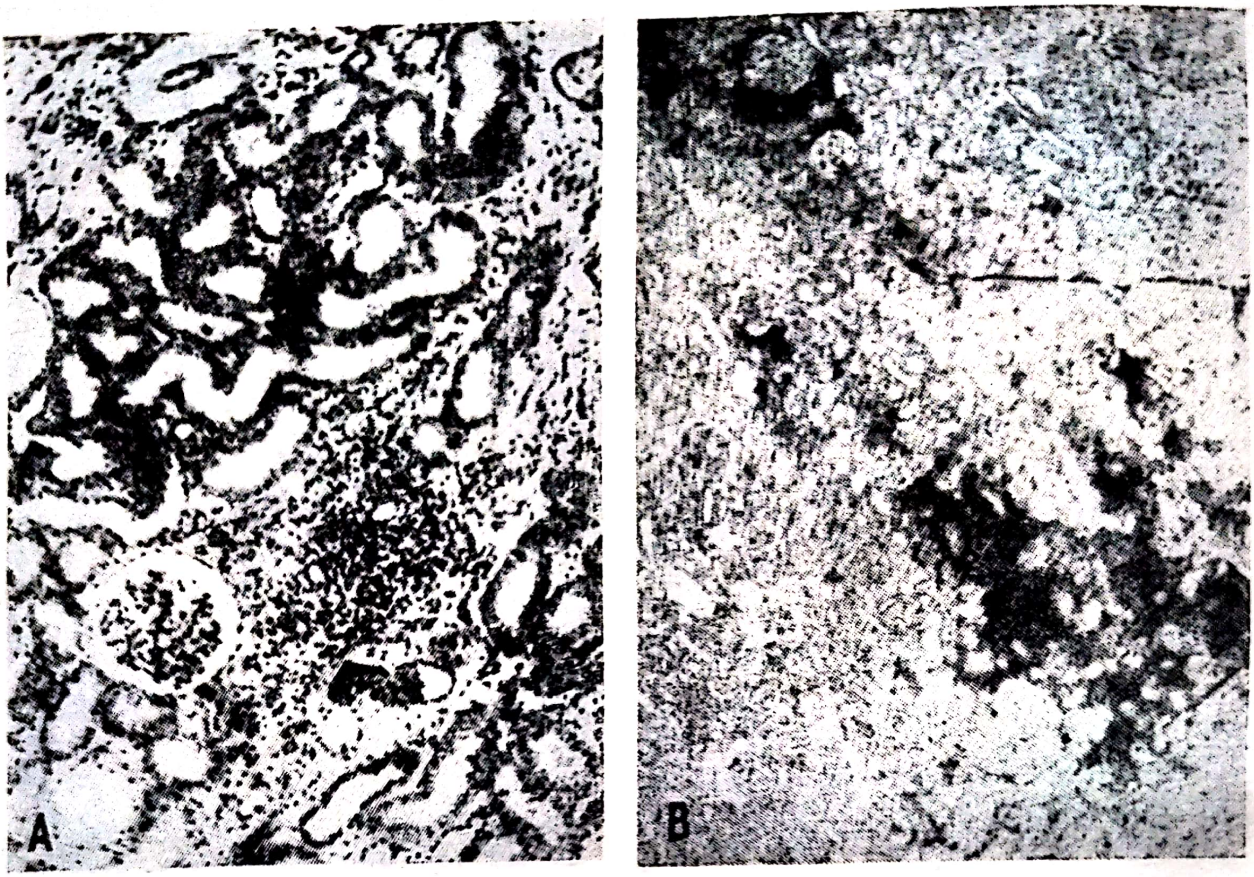


Fig. 90.

A — astpect microscopic al parenchimului unui rinichi canin homotransplantat după 176 de zile de la operaţie (sub terapie imunosupresoare). Elementele parenchimului par normale cu excepţia unor zone mici în care predomină ţesutul interstiţial, cu aglomerare mare de celule mononucleare, mai ales limfocite; *B* — aspectul microscopic al aceluiaşi rinichi la 26 de luni de la operaţie şi 12 luni după întreruperea terapiei imunosupresoare. Zone largi sînt constituite din parenchim aparent normal, dar în zonele de infiltraţie celulară densă, elementele parenchimatoase lipsesc şi apar în mod evident focare de rejecţie progresivă [după Murray şi colab. (645)].

fenomenul poate fi explicat prin dezechilibrul produs de sinteza continuă a constituenţilor celulari în celule împiedicate să se dividă (509, 523, 727). În celulele care în mod normal nu se divid frecvent, leziunea prin iradiaţie poate deveni evidentă numai cînd este indusă diviziunea celulară (9). Distrugerile celulare din ţesutul limfatic şi măduva osoasă, produse de actinomicină (704), pot fi provocate de dependenţa acestor ţesuturi de un ARN-*turnover* rapid, dar nu mai este tot aşa de uşor de explicat necroza intensă pe care o produce acest antibiotic la locurile de injectare. Există de asemenea şi alte circumstanţe în care mecanismul distrugerilor celulare rămîne încă necunoscut (de exemplu, distrugerea rapidă a limfocitelor prin agenţi alchilanţi, cortizon sau radiaţii).

Exemplele de distrugere celulară prezentate mai sus sînt atît de importante, încît sînt detectabile histologic. Trebuie să se ţină seama însă că inhibiţia imunologică poate să fie de fapt expresia distrugerii unei mici fracţiuni celulare, responsabilă de declanşarea răspunsului imun, acest punct de vedere explicînd acţiunea imunosupresoare a unor agenţi care nu ajung să producă distrugeri ample ale ţesutului limfatic.

Presupunerea iniţială că substanţele imunosupresoare fac din gazda homotransplantului un „infirm imunologic" începe a fi socotită ca incorectă; cu

toate acestea, unele animale tratate medicamentos, în special acelea care au primit combinaţii de substanţe, suferă consecinţe contradictorii, cum ar fi consumpţia şi hiperpirexia, care devin evidente, alături de multe alte fenomene detectabile la gazdă şi grefă în perioadele tardive ale tratamentului imunosupresor.

Murray şi colab. (645) consideră că terapia medicamentoasă nu produce „infirmi imunologici", pentru că animalele cu homotransplant renal tratate astfel elimină succesiv grefele de piele, indiferent de sursă (adică grefe de piele provenind de la un donator oarecare sau grefe de piele provenind de la donatorii respectivi de rinichi) şi de asemenea prezintă unele semne de eliminare în parenchimul rinichiului transplantat (fig. 88).

Acţiunea acestor substanţe este de scurtă durată, ceea ce face ca întreruperea unui tratament care durează de 6 luni să fie urmată de eliminarea homotransplantului (642).

Aceleaşi observaţii au fost făcute şi de Porter şi colab. (716) pe câini trataţi cu 6-MP sau alt derivat purinic (Imuran). Pe 150 de rinichi canini homotransplantaţi sub tratament, care au încetat să funcţioneze înainte de 28 de zile, s-a observat dezintegrarea capilarelor peritubulare şi dezvoltarea necrozei fibrinoide a pereţilor arteriolari şi arteriali (fig. 90).

Aceleaşi leziuni au fost semnalate şi la oameni cu homotransplant renal aflaţi sub tratament cu aceste substanţe imunosupresoare (fig. 89).

1. ACTINOMICINELE

Actinomicinele (AM), un grup de cromopeptide strîns înrudite, produse de actinomicete, au fost descoperite în 1940 de Waksman şi Woodruff (927). Membrii grupului sînt desemnaţi prin litere. În tabelul 44 au fost sistematizate aceste antibiotice după proveniență şi anul izolării. Din punct de vedere chimic se deosebesc foarte puţin între ele şi anume prin structura şi secvenţa aminoacizilor din lanţul polipeptidic, gruparea cromoforă fenoxazonică fiind comună. Lanţul polipeptidic al AM este constituit din 8—10 aminoacizi. De exemplu, în cele două lanţuri polipeptidice ale actinomicinei C_1, una din componentele actinomicinei C (AMC) care este o substanţă complexă, intră *l*-treonina, *d*-valina, *l*-prolina, sarcozina şi N-metilvalina (fig. 91); actinomicina C_3 cuprinde în cele două lanţuri polipeptidice ale sale *l*-treonina, *d*-aloizoleucina, *l*-prolina, sarcozina şi *l*-N-metilvalina; actinomicina C_2 conţine o moleculă de valină în plus în fiecare lanţ polipeptidic; între structura actinomicinei C_1 şi a AMD nu există practic diferenţe; lanţul polipeptidic al actiomicinei F_1 nu conţine prolină; aurantina are în partea sa polipeptidică treonină, sarcozină, prolină, valină, N-metilvalină şi izoleucină (506).

Dintre aceste antibiotice, actinomicina D (AMD) a fost studiată mai mult. Această AM este un antibiotic cu o culoare roşie strălucitoare, constituit din 2 peptide (923) şi posedă o puternică activitate antibacteriană (germenii grampozitivi) (728).

Waksman (925, 926) a consacrat un studiu de sinteză actinomicetelor şi AM, precum şi importanţei acestora în tratamentul tumorilor la om şi animale. În studii asemănătoare, Reich (745, 746) a prezentat efectele AM asupra diverselor sisteme funcţionale ale organismului. În încercările iniţiale

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 44

Actinomicinele principale, proveniența lor și dozele terapeutice

Actinomicinele	Actinomicetele din care s-au izolat	Doze terapeutice *	Autorii
A	*Streptomyces (Actinomyces) antibioticus*	—	Waksman și Woodruff, 1940 (927)
C (Sanamicina) C_1 C_2 C_3	*Streptomyces chrisomallus*	1,5—6 μg/kilocorp/zi (5—6)	Brockman și Grubhofer, 1949 (115) Hirata și Nakanishi, 1949 (405)
D	—	15 μg/kilocorp/zi (5—6)	Manaker și colab., 1954 (558)
F_1	—	—	Hackmann și Schmidt-Kastner, 1957 (352)
K	*Streptomyces melanochromogenes*	25—50 μg/kilocorp/zi (6—8)	Tsai, 1959 [citat de (506)]
Aurantina	*Actinomyces aurantiacus*	500 μg/48 de ore	Soloviova și Belova, 1950 [citat de (506)]

* În paranteze: durata în zile a unei serii de tratament.

efectuate în scopul stabilirii acțiunii lor antibiotice, AM s-au dovedit a avea o oarecare toxicitate, fapt ce a condus mai tîrziu la introducerea lor în categoria agenților antineoplazici (182, 183, 253, 273, 351, 352, 623, 704, 738, 750, 775, 787, 788, 878); sub acest aspect însă, efectul terapeutic al AM este în general destul de scăzut (773).

Mai recent, pe baza faptului că evidența efectelor biochimice specifice ale AM s-a mărit, acești agenți și-au găsit o largă utilizare în cercetarea biologică. Unul din domeniile cercetării biologice în care AM pare a avea un loc mai important este transplantarea organelor și țesuturilor, a căror eliminare o întîrzie sau o abrogă (138, 710, 984).

a) **Efectele principale ale actinomicinelor.** *Inhibiția unor fenomene morfologice și fiziologice.* La fel ca și efectul citotoxic al radiației ionizante, efectele citotoxice ale AM la animalul normal se manifestă în primul rînd în țesuturile cu regenerare rapidă, ca epiteliul intenstinal, măduva osoasă și țesuturile limfoide (391, 684, 704). După tratamentul cu AM, cele mai puternice efecte sînt tulburările funcționale gastrointestinale, consecutive denudării mucoasei intestinale (704), leucopenia și scăderea însemnată a rezistenței față de infecție (684).

Era de aşteptat ca ţesuturile embrionare şi ţesuturile tinere ale animalelor în creştere să fie de asemenea afectate de aceste substanţe şi, într-adevăr, creşterea normală şi dezvoltarea anumitor sisteme ale organismului sînt profund influenţate de AM. Astfel, Brachet şi Denis (97) au demonstrat în experienţe pe *Acetabularia* că AMD opreşte creşterea şi diferenţierea, fapt demonstrat şi pe embrionul de broască (278), pe embrionul de găină (473) şi pe embrionul de şoarece (809). La şobolance şi iepuroaice în gestaţie, AM provoacă avorturi sau malformaţii fetale (903). Apariţia malformaţiilor embrionare în cursul administrării AM a fost constatată şi la embrionul de găină (711, 712).

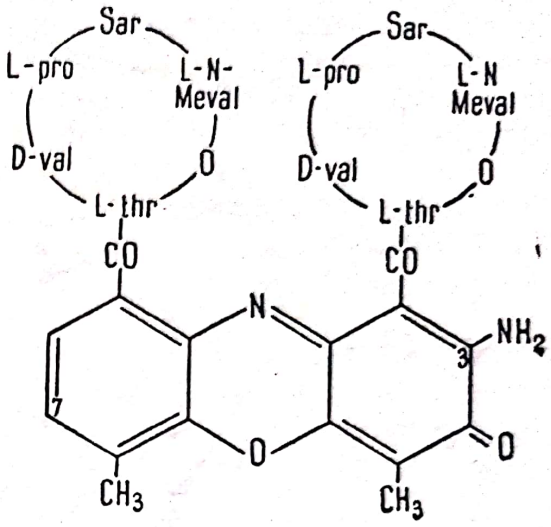


Fig. 91. — Structura actinomicinei C_1 (D); L-thr, *l* — treonină; D-val; *d* — valină; L-pro; *l* — prolină; Sar, sarcozină; L-N-Meval, *l* — N-metilvalină [după Brockmann (114)].

În culturi de ţesuturi normale de mamifer, AMD inhibează creşterea celulelor (232, 701), suprimă mitozele (164, 177) şi produce fragmentarea nucleului celular (69), cu pierderea nucleolilor şi a conţinutului de ARN evidenţiabil histochimic (312, 763), fenomene asemănătoare acelora observate şi în ţesuturile tumorale tratate cu acest antibiotic (218, 352, 449, 860). Numeroase cercetări experimentale au arătat că AMD este foarte activă asupra unor tumori transplantabile ale şoarecilor: adenocarcinomul mamar, melanoblastomul S-91, leucoza transplantabilă (251, 252) şi glioblastomul (251). Ea inhibează de asemenea creşterea unor tumori umane (carcinoame şi melanoame) heterotransplantate la şobolani şi hamsteri (612).

Actinomicinele întîrzie răspunsul imun al şoarecilor şi şobolanilor faţă de eritrocite de oaie şi faţă de β-galactozidază (870, 872), inhibează formarea anticorpilor *in vitro* de către ţesutul limfatic de cîine şi iepure (737, 909), inhibează apariţia heterohemaglutininelor la găină (680) şi inhibează de asemenea producerea *in vitro* a γ-globulinelor de către limfocitele umane, indusă prin fitohemaglutinine (406). Gifford şi Heller (296) au constatat că şi producerea interferonului în culturi de celule embrionare de găină infectate cu virus *Chinkungunya* este inhibată de AMD. Uhr (909) a arătat că 5×10^{-8} M AMD poate inhiba complet atît continuarea formării primare a anticorpilor, cît şi răspunsul secundar indus *in vitro* la bacteriofag T_2 (fig. 92).

Ambrose şi Coons [citaţi de (909)] au constatat de asemenea că răspunsul imun secundar este inhibat *in vitro* de concentraţii mici de AMD, iar Jerne şi colab. [citaţi de (909)] au găsit că acest antibiotic inhibează formarea anticorpilor *in vivo* la şoarece.

Există însă o serie de autori care nu au putut evidenţia vreun efect al AM asupra răspunsului imun şi anume: Šterzl (854) care a determinat cantitatea de anticorpi circulanţi eliberaţi prin inocularea antigenului extras din *Brucella suis*, după şi fără administrarea AMD, şi Schwartz şi André (791) care au găsit că

AMC nu suprimă răspunsul imun. Faţă de multitudinea lucrărilor cu concluzii contrare, exactitatea acestor date devine îndoielnică.

Este de semnalat faptul că pe măsură ce celulele se diferenţiază şi se maturizează, îşi pierd sensibilitatea faţă de AM, fapt demonstrat de Wessells (941)

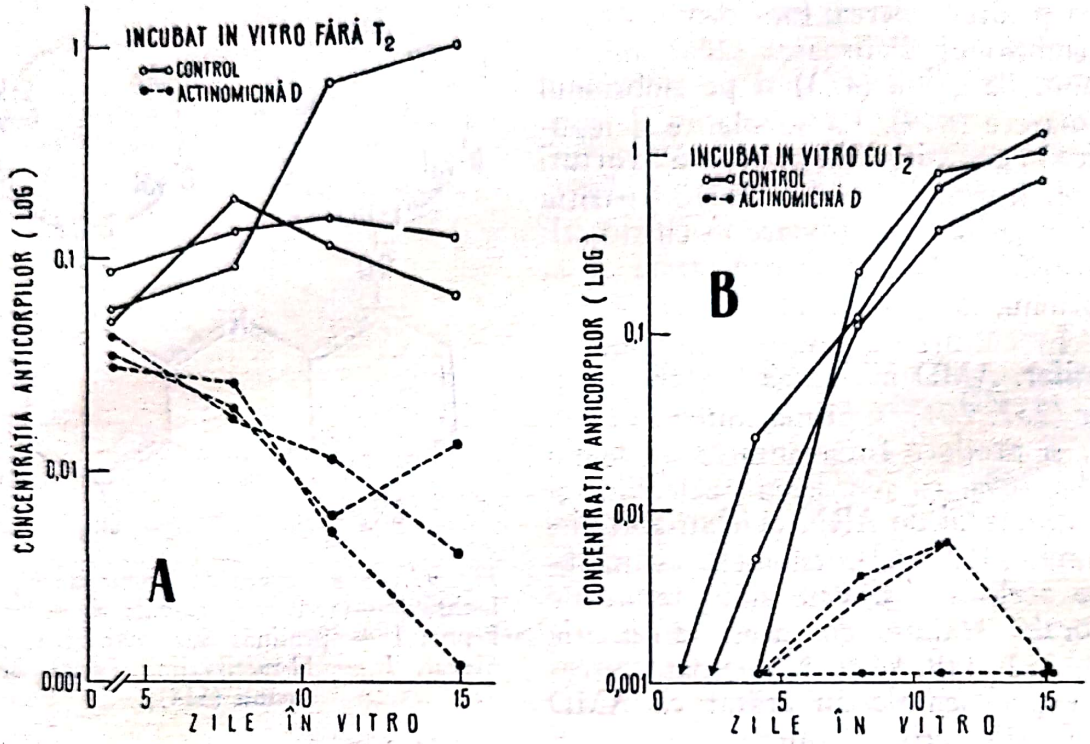


Fig. 92. — Concentraţia anticorpilor antibacteriofagi T_2 după adaos de AMD (3×10^{-7} M) (*A* — incubaţie *in vitro* fără bacteriofag T_2; *B* — incubaţie *in vitro* în prezenţa bacteriofagului T_2) [după Uhr (909)].

pe celule pancreatice exocrine. Toxicitatea mare a acestor antibiotice asupra celulelor nediferenţiate a dus la folosirea lor cu succes în tratamentul unor tumori nediferenţiate, cum este coriocarcinomul (762) sau limfomul malign (675).

Folosind capacitatea AM de a suprima răspunsul imun, MacPhee şi Wright (546) au realizat transplantarea plămînului la cîine; Calne şi colab. (143) au realizat transplantarea rinichiului la cîine, iar Murray şi colab. (644) transplantarea rinichiului la om.

b) **Efectele biochimice ale actinomicinelor.** *Inhibiţia sintezei proteinelor.* Sinteza proteinelor a fost primul fenomen biochimic despre care s-a aflat că este inhibat de AM. Curînd după aceea s-a demonstrat că AMD acţionează ca un inhibitor competitiv al pantotenatului, ceea ce a sugerat că ea intercepteză reacţiile pantotenat-dependente implicate în sinteza şi utilizarea aminoacizilor (279). Totuşi, la animale s-a dovedit că acidul pantotenic nu antenuează acţiunea toxică şi nici efectele imunosupresor şi antitumoral ale antibioticului (506).

Inhibiţia inducţiei enzimatice adaptative de către AM a fost de asemenea investigată de numeroşi cercetători. Printre aceştia se numără Pollack (715) care a studiat susceptibilitatea unor enzime din *Bacillus subtilis* şi *Bacillus cereus* de a-şi reduce activitatea sub acţiunea AM, Gelboin şi Blackburn (294) care au

Scanned with OKEN Scanner

găsit că efectul inductor enzimatic al 3-metilcolantrenului este blocat de actinomicină și Nismann și colab. (668) care au cercetat efectul acestui antibiotic asupra sintezei β-galactozidazei și a sintezei ARN, indusă în mod specific de către o fracțiune subcelulară de *Escherichia coli*. Actinomicina s-a dovedit a avea efect citostatic asupra culturilor de *Neurospora* și *Streptococcus faecalis*, dar această acțiune este abolită de tratamentul cu ADN (737). Ea inhibează de asemenea creșterea conținutului de ADN-polimerază din ficatul de șobolan după hepatectomie parțială (344), dar nu blochează activarea hormonală a enzimelor hepatice (337). Actinomicina nu inhibează însă activarea de substrat a penicilinazei pentru *Bacillus cereus* (773).

Ulterior au fost comunicate numeroase alte dovezi ale inhibiției sintezei proteinelor de către AM. Nu este stabilit precis dacă acest efect este direct sau indirect. Se pare, totuși, că efectul inhibitor al acestui antibiotic este indirect, așa cum rezultă din observațiile prezentate în continuare.

Deși activitatea specifică a enzimelor mitocondriale nu este afectată în mod deosebit de tratamentul cu AM, activitatea dehidrogenazei succinice putînd rămîne normală chiar după 24 de ore de la instituirea unui asemenea tratament (205), el este urmat de scăderea imediată și susținută a mucopolizaharidelor acide, fapt în corelație cu inhibiția formării anticorpilor.

Incapacitatea AMD de a inhiba sinteza proteică în celulele intacte de *Escherichia coli* se datorează impermeabilității membranei celulare. Cînd această membrană este înlăturată, protoplastele de *Escherichia coli* își reduc considerabil capacitatea de a capta leucina sub acțiunea AM (406, 544). Actinomicina produce blocarea selectivă a captării lizinei în nucleoli (863), ceea ce sugerează că sinteza histonelor nucleare poate fi suprimată selectiv (414). Acest fapt se corelează cu fragmentarea nucleolară care urmează, practic imediat, tratamentului cu AM (69, 449). Probabil că pentru a se asigura integritatea organitelor celulare este indispensabilă continuitatea procesului de sinteză a proteinelor (172, 773).

Pe culturi de țesut pancreatic s-a observat că AMD produce, pe lîngă suprimarea activității amilazei, inhibiția apariției granulelor zimogene (341), acest fenomen fiind mai puțin evident pe măsură ce celulele sînt mai diferențiate și mai maturizate (941).

Inhibiția sintezei proteice prin AM nu este totuși imediată, în timp ce sinteza ARN este foarte rapid inhibată de această substanță (12), ceea ce arată că efectul ei asupra sintezei proteice este indirect.

Pe măsură ce s-a ajuns la elucidarea mecanismului sintezei proteice pe calea ARN-*m*, intermediar nestabil purtător al informației de la gene la ribozomi (100), s-a putut studia și efectul AM asupra componentelor sistemului care sintetizează proteine.

Poliribozomii (polizomii) din ficatul de șobolan se dezagregă după tratamentul cu AM (840). Totuși, în celulele infectate cu poliovirus și tratate cu actinomicină, dimensiunile polizomilor cresc (698). Acest paradox poate fi explicat prin ipoteza conform căreia celula eliberează ribozomii săi pentru a se alipi la marile molecule ale ARN-*m* viral. Pentru ca să se formeze acești polizomi giganți trebuie să se producă regruparea ribozomilor existenți, fenomen posibil dat fiind că AM întrerupe foarte rapid formarea noilor ribozomi

Scanned with OKEN Scanner

(301). Interceptarea sintezei proteinelor de către AM poate fi înlăturată prin adaos de fracţiuni de ARN (19) care conţin probabil ARN-*m* sau prin adaos de poliuridilat sau poliguanilat (909), ceea ce înseamnă că ARN este ţinta primară a AM. Totuşi s-a observat că sinteza mitocondrială a proteinelor nu este sensibilă la ribonuclează şi este inhibată numai parţial de AM (488), acest fapt implicînd existenţa unor factori intramitocondriali de protecţie a sistemului ARN sintetizant de proteine. Sinteza ARN-*m* se poate realiza într-o oarecare măsură în mitocondriile în care s-a detectat o cantitate mică de ADN. Astfel se poate explica observaţia, încă disputată, potrivit căreia o componentă a sintezei ARN în celulele animale ar fi rezistentă la acţiunea inhibitoare a actinomicinei (691).

Inhibiţia sintezei acizilor nucleici. Din cele prezentate mai sus se desprinde în mod evident ideea că, în general, AM inhibează sinteza acizilor nucleici în organismul intact şi în preparatele enzimatice. Aceste efecte sînt interesante pentru că ele au putut fi folosite de asemenea în studiul funcţiei genelor şi al unor probleme conexe şi, poate chiar mai mult, pentru că aceste antibiotice desfăşoară acţiuni selective, specifice, a căror cercetare ar putea conduce la cunoaşterea modului de polimerizare care duce la formarea ARN şi, respectiv, ADN, precum şi la realizarea unor modele concrete de reglare fiziologică a activităţii templatului.

În cele ce urmează vor fi prezentate comparativ datele cunoscute în prezent asupra modului în care AM intervine în sinteza ADN şi ARN.

În ceea ce priveşte efectul acestor antibiotice asupra sintezei ADN, se ştie că ele inhibează sinteza ADN-polimerazei la şobolanii hepatectomizaţi (344, 430) şi că acest efect se produce numai dacă se utilizează doze moderate (248) sau mari (431, 472, 748, 821). Cinetica acestei inhibiţii este de aşa natură, încît, pentru a se realiza în proporţie de 100%, este necesar să existe în reacţie un raport molar de 1/1 de AM/ADN-guanină. Această cantitate de AM este mult prea mare faţă de aceea folosită de obicei pentru a provoca efectele sale imunosupresoare. Prin urmare, inhibiţia sintezei ADN nu pare a fi efectul primar al AM.

În schimb, sinteza ARN este de 10—12 ori mai sensibilă la acţiunea actinomicinei decît sinteza ADN (431, 472, 729, 747, 748, 821), fapt explicat prin interferenţa antibioticului cu activitatea ARN-polimerazei (305, 306, 372, 431, 450, 749). În mod corespunzător, activitatea *in vitro* a ADN-polimerazei s-a dovedit a fi mult mai puţin sensibilă la acţiunea AM decît aceea a ARN-polimerazei (431, 472, 821). Reich şi colab. (747) au adus argumente interesante în acest sens, studiind încorporarea ^{3}H-leucinei în proteine, a ^{3}H-uridinei în ARN şi a ^{3}H-timidinei în ADN, în absenţa şi prezenţa AM (tabelul 45). Kirk (472) a descris un complex AM-ADN, spontan disociabil, lucrînd cu culturi de *Staphylococcus aureus*, în care el a găsit că AM opreşte imediat sinteza de ARN, dar produce inhibiţia sintezei proteinelor numai după o perioadă de latenţă, fără a avea vreun efect asupra respiraţiei şi glicolizei. Kersten şi colab. (467) au făcut constatări asemănătoare pe alte bacterii. Reich (746) expune o explicaţie posibilă a sensibilităţii diferite faţă de AM a celor două reacţii de polimerizare a acizilor nucleici. Potrivit acestei explicaţii, inhibiţia ARN-polimerazei de către AM ar putea reflecta o interferenţă sterică directă a funcţiei

Scanned with OKEN Scanner

enzimatice cu moleculele AM legate la porţiunile ADN-templatului, care participă în mod normal la formarea ARN; pe de altă parte, inhibiţia ADN-polimerazei poate fi atribuită modificării proprietăţilor fizice ale templatului, rezultînd din legarea unei mari cantităţi de AM, mai curînd decît dintr-un efect

Tabelul 45

Încorporarea unor precursori marcaţi în proteine, ARN şi ADN *

Precursorul	Control	Tratament cu AMD
^{3}H-leucina (în proteine)	59 980	49 620
^{3}H-uridina (în ARN)	160 000	66 500
^{3}H-timidina (în ADN)	194 000	181 000

* Valorile sînt exprimate în impulsuri/min. (pentru probe egale de celule cultivate şi pentru o durată de incubaţie cu AM de 30 de minute înainte şi 3 ore şi jumătate după adăugarea compuşilor marcaţi la mediul de reacţie) [după Reich şi colab. (747)].

steric. Explicaţia sa este argumentată cu următoarele observaţii: a) ARN-polimeraza este inhibată de concentraţii mai mici de AM decît este ADN-polimeraza; b) inhibiţia ARN-polimerazei se accentuează pînă la realizare totală între limite ale concentraţiei AM care nu afectează stabilitatea termică a templatului; c) valorile raportului AM/ADN la care se realizează inhibiţia ADN-polimerazei corespund în mod evident acelora care dau naştere unor creşteri progresive ale Tm (temperatura de tranziţie).

Pare plauzibilă posibilitatea ca distribuţia invariabilă, restrictivă, a grupărilor funcţionale ale ADN să constituie temeiul specificităţii enzimatice a polimerazelor acizilor nucleici. Toate datele disponibile privind activitatea acestor enzime subliniază eventualitatea ca replicarea templatelor să se producă pe calea unui mecanism în care secvenţele să fie determinate de tipul împerecherii bazelor din ADN. Dacă aceasta este într-adevăr situaţia, sistemul legăturii de hidrogen al helixului nativ ar putea fi rupt, cel puţin la locul acţiunii enzimei. Legăturile de hidrogen, care înlănţuie perechile de baze, sînt localizate central în jurul axului helixului; legăturile de hidrogen între oricare pereche de baze ar putea fi rupte de intervenţia enzimei în oricare canelură a moleculei acidului nucleic. Denaturarea unui segment scurt ar permite bazelor afectate să pivoteze, făcînd posibile noi împerecheri de baze în fiecare canelură a moleculei de ADN. Pare semnificativ faptul că proflavina, despre care se crede că se intercalează între perechile succesive de baze (517), afectînd astfel structura ambelor caneluri ale ADN, inhibează în mod neselectiv amîndouă polimerazele acizilor nucleici (305, 431), în timp ce AM, despre care se presupune că realizează legături cu ADN numai în zona canelurii sale minore (364), prezintă o marcată selectivitate în acţiunea sa asupra aceloraşi enzime. Prin urmare pare logic să se presupună că fiecare dintre aceste enzime „priveşte" secvenţele bazice ale ADN numai dintr-o canelură. ARN-polimeraza este dislocată din ADN de către AM (304). Dacă se consideră că AM se dispune în canelura minoră a

moleculei de ADN, este de presupus că această canelură reprezintă zona templatului specific al sintezei ARN și, poate, a reglării sale. Astfel, replicarea ADN ar urma să se realizeze din canelura majoră a moleculei.

S-a observat că inhibiția sintezei ARN prin AM este competitivă și poate fi anulată prin exces de ADN (305, 307). Resturile guaninice s-au dovedit a fi necesare pentru a lega AMD de ADN (306, 450), așa cum se întîmplă și în cazul AMC care se poate lega de guanină și dezoxiguanină (465). Este interesant că acești compuși purinici produc în soluțiile de AM aceleași modificări spectrale ca și ADN. S-a stabilit următoarea ordine descrescîndă a intensității acțiunii compușilor purinici asupra curbelor spectrale ale soluțiilor de AM: dezoxiguanozină >guanozină >adenină, AMP, ADP, ATP, adenozină și dezoxiadenozină, care acționează în mod egal. Inozina, xantozina, precum și bazele pirimidinice normale și nucleozidele nu sînt active în acest test (465).

Kahan și colab. [citați de (909)] au arătat că AMD se fixează specific la resturile de dezoxiguanozină ale ADN nativ, dar are o afinitate slabă față de ADN denaturat. Forțele care leagă AM de ADN nativ par a fi mai puternice decît acelea care acționează pentru menținerea structurii însăși a ADN (746).

Aceste observații sînt folosite de unii autori (746) pentru a justifica amplificarea modelului reacțional simplu AM-ADN, prezentat mai sus. Argumentele lor suplimentare sînt: a) dezoxiguanozina liberă este de 10—20 de ori mai puțin efectivă în producerea modificărilor spectrale caracteristice în soluțiile de AM decît dezoxiguanozina din ADN; b) cu toate că dezoxiguanozina s-a dovedit cel mai activ dintre compușii testați, guanozina și adenina nu au o activitate neglijabilă asupra curbelor spectrale ale soluțiilor de AM. Ca atare se poate presupune că adenina din ADN, ca și din ARN, și guanina din ARN pot reacționa cu AM. Totuși, nici adenina din ADN (307, 450), nici ARN (364) nu pot face complexe stabile cu AM. De aceea apare logică ideea unor autori (746) care susțin că particularitățile structurale ale ADN responsabile de capacitatea sa de a forma complexe chimice nu pot fi deduse numai din studiul unui model de reacție limitat. Modelul de reacție ar trebui să cuprindă un număr mare de purine analoge lor și derivați cu variații structurale care să afecteze aproape toate pozițiile inelului purinic. Asemenea încercări efectuate de Reich (746) au arătat că exceptînd purina liberă, fără vreo substituție, care este inactivă, toți compușii din grupele menționate produc modificări spectrale ale soluțiilor de AM foarte asemănătoare acelora produse de ADN și dezoxiguanozină, deși există diferențe cantitative de reactivitate. Nici una dintre grupările structurale ale inelului purinic nu s-a dovedit indispensabilă pentru reacția compușilor liberi cu AM. Această lipsă a unor condiții structurale prealabile, specifice pentru reacția purinelor și nucleozidelor, este în contrast marcat cu reacția acizilor nucleici, la care numai guanina din ADN reacționează cu AM.

De cînd se cunoaște în amănunt structura helicoidală a ADN (500), aranjamentul grupărilor purinice care pot fi disponibile pentru reacția cu moleculele de AM a devenit mai ușor de definit. Tipul de reactivitate, nespecifică, a purinelor libere nu pare a fi asemănător aceluia al grupelor funcționale purinice din molecula de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Hamilton şi colab. (364) au găsit că în filamentele complexelor AMD-ADN nu se produce tranziţia conformaţională B → A, care se realizează în mod normal în filamentele de ADN în condiţii reacţionale banale, cum ar fi hidratarea sau deshidratarea. Folosind mecanismul formării unei legături specifice de hidrogen, descris pentru prima dată de Hartmann şi colab. (372, 373), ei au propus un model pentru structura acestor complexe, în care cromoforul AMD este legat la hidrogenul grupării aminice a guaninei şi puntea de oxigen a dezoxiribozei, iar peptidele ciclice ale AMD se dispun de-a lungul canelurilor înguste ale moleculei spiralate de ADN. Intercalarea cromoforului AM între perechile adiacente de baze ale ADN după modalitatea descrisă în cazul proflavinei (517) este puţin probabilă (364, 746), dat fiind că: a) nu justifică necesitatea guaninei, a lactonelor AM sau a grupării aminice a acesteia; b) mărimea lanţului peptidic previne, în general, intercalarea unei părţi mai mari a cromoforului şi, în mod specific, intercalarea grupării aminice; c) prezenţa grupării voluminoase stearilaminice în poziţia 7 a cromoforului AM este incompatibilă cu intercalarea şi, totuşi, 7-stearilaminoactinomicina, ca şi 7-bromactinomicina (638) reacţionează, practic normal, cu ADN.

Următoarele observaţii pot fi adăugate acelora citate de Hamilton şi colab. (364), în favoarea modelului potrivit căruia AM se dispune pe canelura minoră a helixului ADN: a) legarea AM la ADN nu este împiedicată de prezenţa glucozei în canelura majoră a numeroase specii de ADN fagic. Fiecare rest de hidroximetilcitozină (HMC) a ADN din bacteriofagul T_4 este glucozilat (479) şi resturile glucidice pot interfera intercalarea cromoforului AM, prin prevenirea apropierii lanţurilor sale peptidice de suprafaţa helixului. În ciuda glucozilării şi a conţinutului său scăzut de guanină, ADN din bacteriofagul T_4 este ceva mai eficient în legarea AM decît ADN din timusul de viţel (746); b) legarea AM la ADN suprimă activitatea templatului pentru sinteza ARN (306, 307, 450). Acest efect s-ar putea realiza cu uşurinţă în canelura minoră a helixului ADN, care poate fi acoperită complet de antibiotic; c) amestecul de homopolimeri sintetici ai acizilor polidezoxiinozinic şi polidezoxicitidilic (478) se aseamănă cu amestecul de homopolimeri sintetici ai acizilor dezoxiguanilic şi dezoxicitidilic (730), exceptînd absenţa din cel dintîi amestec a grupării 2-aminice a guaninei. Amestecul de homopolimeri sintetici ai acizilor polidezoxiinozinic şi polidezoxicitidilic nu reacţionează cu AM (746).

Una dintre particularităţile acestui model reacţional AMD-ADN este că pentru legarea AMD este necesar ca molecula de ADN să se afle în conformaţia stereochimică de tip B. Aşadar, formarea complexului AM-ADN este condiţionată, pe de o parte, de prezenţa dezoxiguanozinei în molecula acestuia din urmă, iar pe de altă parte, de o anumită conformaţie structurală a acestei molecule.

Acest model de constituire a complexului AMD-ADN corespunde modificărilor spectrului lor de absorbţie studiat de Kirk (472), Rauen şi colab. (737) şi Reich şi colab. (749). Haşelkorn (381) a verificat modelul de mai sus al complexului AMD-ADN, folosind ca indicator disociaţia termică a ADN. El a considerat că, dacă acest model este exact, AMD ar trebui să mărească stabilitatea moleculei helicoidale de ADN în soluţie, iar datele pe care le-a prezentat au demonstrat acest punct de vedere. Aceste date sînt concordante cu acelea obţinute de Sinsheimer (818), care a lucrat cu bacteriofag ΦX-174.

Scanned with OKEN Scanner

Evidența actuală este însă insuficientă pentru a se putea stabili o relație validă între capacitatea de a fixa AM și conținutul de structuri helicoidale din preparatele de ADN.

Diferențele minore de comportament ale diverselor serii de ADN față de variațiile temperaturii în prezența AMD sînt puse de Geiduschek (293) pe seama conținutului nealterat de guanină-citozină al ADN, considerat ca nuclee de guanină-citozină în molecula de ADN, persistente, ca mici regiuni moleculare autonome, cînd restul moleculei s-a disociat, servind apoi ca nuclee de reasociație, cînd temperatura revine la nivelul inițial. Actinomicina D accentuează diferențele în disociația termică a diverselor serii de ADN, dar nu are efect asupra disociației termice a ARN solubil din *Escherichia coli* (381), care s-a dovedit a avea o conformație helicoidală de tip A (835) și nici asupra ARN complementar al bacteriofagului T_7 produs din DNA acestui bacteriofag sub acțiunea ARN-polimerazei din *Micrococcus lysodeikticus*, ceea ce înseamnă că nici acest ARN nu conține regiuni helicoidale de tip B (381).

Numeroase modificări în diverse porțiuni ale moleculei de AM pot afecta proprietățile sale inhibitoare într-o măsură mai mare sau mai mică (114, 372, 373, 638, 749). Reich (746) subliniază că există totuși cîteva grupări funcționale caracteristice în această moleculă, indispensabile pentru menținerea activității sale biologice, și că orice ipoteză care-și propune să explice reacția AM cu ADN trebuie să țină seama de ele. Aceste grupări funcționale sînt: a) gruparea aminică cromoforă liberă: numai unul dintre hidrogenii acestei grupări poate fi substituit și atunci numai cu o grupare metil, această modificare fiind asociată cu o pierdere de activitate de 90% (638, 794); b) sistemul ciclic chinoidal neredus (746): reducerea chinonei distruge configurația spațială a acestui sistem ciclic și convertește oxigenul chinoidal (un acceptor potențial de hidrogen efectiv pentru constituirea unei punți de hidrogen) într-un oxigen fenolic; c) inelele lactonice: acestea asigură o formă compactă și o orientare spațială definită a constituenților peptidici ai moleculei. Acidul dicarboxilic care rezultă din hidroliza lactonelor ale căror lanțuri peptidice au probabil o structură variabilă, flexibilă, este singurul derivat al AM care nu a fost cristalizat încă. El este, de altfel, lipsit de activitate biologică (638) și nu poate forma complexe cu ADN (472, 638, 821). Aceste fapte sugerează că acele structuri ale AM care participă la reacția de cuplare cu ADN pot avea o configurație reactivă determinată de lactone.

În legătură cu aceste observații este interesant de semnalat comportamentul unor derivați ai AM. De exemplu, N-dimetilenactinomicina, un derivat în care o structură ciclică dimetilen înlocuiește cei doi hidrogeni ai grupărilor aminice libere din antibioticul natural nu inhibează *Bacillus subtilis* (638) sau celulele L (746) și nici formarea ARN de către ARN-polimerază în reacția în care ADN din timusul de vițel este substrat (746). Spectrul N-dimetilenactinomicinei în regiunea vizibilă nu este modificat de prezența ADN, iar precipitarea acestuia din urmă în prezența acestui derivat de AM duce la formarea de filamente incolore (746), în loc de filamente galbene-portocalii, care apar în prezența AM active biologic (364). În contrast cu inerția sa față de ADN, N-dimetilenactinomicina este foarte activă în modelul reacțional care cuprinde dezoxiguanozina: spectrul său se modifică în mod remarcabil în prezența aces-

Scanned with OKEN Scanner

teia. N-dimetilenactinomicina reacţionează în mod similar cu alţi compuşi purinici şi produc modificări spectrale identice calitativ acelora produse în cazul dezoxiguanozinei. Ordinea de reactivitate a acestora este: dezoxiguanozină > diaminopurină > guanozină > adenozină > benzimidazol (746). Aşadar, un derivat al AM, lipsit de activitate biologică şi incapabil să formeze complexe cu ADN, interacţionează puternic cu o serie întreagă de compuşi purinici. În reacţia cu AM, ADN este ceva mai mult decît un simplu nucleozid purinic reactiv. Această observaţie face mai rezonabilă presupunerea că structura tridimensională a ADN prezintă o orientare specifică a grupărilor funcţionale pe seama căreia se realizează reacţia cu AM. Astfel se explică faptul că atunci cînd numeroase alte molecule sînt ataşate la helixul ADN apar nu numai modificări de reactivitate chimică, ci şi modificări ale proprietăţilor fizice. De exemplu, vîscozitatea soluţiilor de ADN creşte într-o oarecare măsură în prezenţa AM [Müller şi Lerman, citaţi de (746)], deşi această creştere de vîscozitate este considerabil mai mică decît în cazul proflavinei (514). Efectul termostabilizator al AM asupra ADN (efect dependent de legătura specifică dintre aceste molecule) este un alt asemenea exemplu. Astfel, Tm al copolimerului dezoxiadenil-dezoxitimidilic (778), care nu leagă AM (307, 450), nu este afectată de antibiotic. Derivaţii AM, a căror capacitate de a forma complexe cu ADN este abolită parţial sau total, prezintă o scădere corespunzătoare a capacităţii de a ridica Tm a ADN (746). O comparaţie între termostabilitatea complexului AM-ADN şi aceea a complexului AM-dezoxiguanozină arată de asemenea că persistenţa asocierii AM-ADN este condiţionată de conformaţia structurală a ADN şi că termosensibilitatea acestui complex se evidenţiază brusc de îndată ce ADN se denaturează, în timp ce complexul AM-dezoxiguanozina prezintă o termolabilitate continuă, începînd cu cîteva grade deasupra temperaturii camerei (466). În aceeaşi ordine de idei, aşa cum au observat Izawa şi colab. (435), cromozomii izolaţi de la o anumită specie de insecte îşi pierd flexibilitatea, devenind rigizi într-un timp foarte scurt, cînd se află în prezenţa AM.

Hurwitz şi colab. (431) au constatat că AMD nu afectează efectul polidezoxitimidilatului, în timp ce Amos (19) a arătat că activitatea templatului cu poliuridină persistă după tratament, ceea ce aduce o evidenţă suplimentară asupra legăturii specifice dintre activitatea AM şi grupările guaninice asupra cărora aceste antibiotice acţionează într-o manieră care împiedică funcţia lor în ADN-templat. Alţi autori (368), studiind acţiunea inhibitoare a AM asupra sintezei ARN la *Neurospora* şi în celulele ascitice din tumori Ehrlich, au sugerat că AM blochează acele grupări din ADN de care se leagă ARN. Numeroase alte observaţii pledează în acelaşi sens (372, 373, 821). Astfel se explică faptul că AMD nu afectează complexul hibrid ADN-ARN (381).

În prezent pare a fi, deci, stabilit că AM acţionează prin inhibarea specifică a formării ARN, pe care o dirijează ADN, această inhibiţie specifică datorîndu-se cuplării AM cu grupările guaninice ale ADN. În sprijinul acestei afirmaţii s-au publicat şi alte date, obţinute pe celule hepatice (611), celule HeLa (877) şi celule L de şoarece (748).

Actinomicina legată la zonele conţinătoare de guanină ale moleculei helicoidale a ADN inhibează în mod direct ARN-polimeraza (fără ca acest proces să aibă vreo consecinţă fizică evidentă), blocînd acele zone ale ADN-templa-

Scanned with OKEN Scanner

tului care participă la activitatea enzimatică. Deoarece o cantitate de AM care inhibează aproape complet sinteza ARN dependentă de ADN nu afectează activitatea ADN-polimerazei, se poate conchide că în cursul replicării ADN activitatea polimerazică este îndeplinită de zone moleculare care nu sînt blocate de AM. Avînd în vedere homogeneitatea probabilă a zonelor implicate în formarea complexului (450), se poate presupune că activitatea ADN-polimerazei nu se interferează cu AM legată la ADN. Interferența AM cu activitatea ADN-polimerazei, observată eventual în cazul utilizării unor cantități mari de antibiotic, reprezintă acțiunea indirectă a acestuia, coincide cu creșterea apreciabilă a Tm și poate fi atribuită modificării condițiilor necesare replicării ADN-templatului.

În această ordine de idei sînt de menționat și cercetările lui Wust și colab. (972), care au arătat că AMD întîrzie desfășurarea fazei de inducție a sintezei anticorpilor, fără a afecta producția totală de anticorpi, implicația acestor observații fiind sinteza ARN-*m* dependentă de ADN în cursul fazei de inducție a formării anticorpilor. Franklin (283) conchide că „inhibiția completă a sintezei tuturor speciilor de ARN de către AM este demonstrată, fapt care dovedește că sinteza oricărui ARN în celulele normale de mamifer este dirijată de ADN-templat". Excepțiile de la această generalizare pot fi puse pe seama sistemelor ADN-ARN, protejate de contactul cu AM; sinteza ARN, care s-a dovedit a persista după tratament cu AM, poate fi de asemenea expresia unei adițiuni de grupare finală la moleculele existente de ARN fără utilizarea ADN-templatului.

Cu toate că inhibiția de către AM a sistemului sintetizant de ARN, controlat de ADN, este făcută reversibilă prin adaos de ADN în exces, efectele *in vivo* ale AM nu sînt practic reversibile. Astfel s-a constatat că administrarea ADN, concomitent cu AMD, la embrionul de găină nu are efect de reducere a malformațiilor provocate de AMD, în timp ce administrarea simultană a AMD cu guanozina și dezoxiguanozina agravează în mod evident aceste malformații.

Din cele de mai sus se poate vedea că de la studiile de sinteză ale lui Wheeler și Bennett (944), din anul 1962, asupra implicațiilor biochimice ale AMD, s-au realizat progrese importante. Un studiu mai recent al lui Samuels (773, 774) realizează o amplă trecere în revistă a noilor cunoștințe privind modul de acțiune a AM. În general, în timp ce unele detalii în acest domeniu sînt încă neclare, majoritatea observațiilor subliniază inhibiția polimerizării ARN pe ADN-templat, ca primă acțiune specifică a AM.

Datele prezentate mai sus sugerează, prin urmare, că formarea anticorpilor este legată de sinteza ARN dependentă de ADN și, anume, de formarea ARN-*m*. Inhibiția promptă și completă, produsă de AM, a sintezei de anticorpi se datorește mai curînd efectului său asupra ARN-*m* decît asupra altei forme mai stabile de ARN citoplasmatic și demonstrează că acest ARN-*m* poate avea o viață de numai cîteva zile. Această observație este concordantă cu concluzia studiilor lui Wust și Astrachan (971), care au arătat că orice stimul antigenic accelerează metabolismul ARN în splină, chiar începînd cu primele 2 zile.

Scanned with OKEN Scanner

Cu toate acestea, în prezent se ridică o problemă, deocamdată fără soluție, de o foarte mare însemnătate și anume, dacă ARN-*m* poartă informația de specificitate imunologică.

Ceea ce ni se parte foarte interesant pentru a fi speculat în viitor în efortul de a descoperi posibilitățile de înlăturare eficientă, de lungă durată, a eliminării organelor transplantate, este faptul că, așa cum reiese foarte clar din literatura curentă, altfel generatoare de multe controverse și ambiguități, AM și virusurile pot acționa în unele împrejurări în mod complementar, iar în altele antagonic (284).

Sinteza macromoleculelor din celula-gazdă este inhibată de numeroase virusuri. De exemplu, atît sinteza proteinelor, cît și a ARN pot fi inhibate de către virusul vaccinal sau virusuri-ARN, în timp ce sinteza ADN este inhibată de reovirusuri (317). În baza acestor observații se poate spune că efectele virusurilor asupra celulelor-gazdă sînt similare efectelor AM, deși mecanismele lor de acțiune pot diferi. Efectul AM asupra virusului însuși depinde în largă măsură de conținutul virusului în ARN sau ADN (647, 807, 880). Astfel, multiplicarea virusului vaccinal, un virus-ADN, în culturi de țesuturi este influențată de AMD, dar într-o măsură ceva mai mică decît este influențată diviziunea celulelor-gazdă; creșterea virusului *Mengo*, un virus-ARN, nu este afectată de AM (747). În celulele HeLa infectate cu virus vaccinal, sinteza proteinelor virale continuă chiar dacă sinteza ADN celular este blocată, dar încetează de îndată ce AM oprește sinteza ARN (807). Virusul sarcomului Rous este complet inhibat de AM, atît infectarea celulelor, cît și inițierea înmulțirii virusului fiind afectate, fără dezvoltarea demonstrabilă a vreunei rezistențe genetice (880). AM inhibează înmulțirea virusului gripal, dar nu și înmulțirea virusului *Newcastle*, observații în corelație cu concluziile altor cercetări, potrivit cărora ADN conținut în celule-gazdă este direct responsabil de sinteza ARN în virusul gripal și nu este responsabil de sinteza ARN în virusul *Newcastle* (47). Partea esențială a ADN din celulă, necesară pentru sinteza ARN viral, este relativ mică și pare a fi constituită de acea parte a ADN din celula-gazdă pe care Kroon (488) a localizat-o în mitocondrie. Creșterea virusurilor ARN în prezența AM se poate explica prin independența replicării virusului față de sinteza ADN-ARN în celula-gazdă (388). Poliovirusurile și reovirusurile s-au dovedit a iniția sinteza ARN în celulele al căror ARN a fost blocat cu AM (806), cu aminopterină sau 5-bromuracil (812), fapt care ilustrează de asemenea această independență a sintezei ARN viral față de sinteza ARN din celula-gazdă. Dar această independență nu este universală. Wheelock (945), care a constatat că virusul *Newcastle* prezintă o multiplicare crescută după tratament cu AM, sugerează că în acest caz, antibioticul a înlăturat ARN-*m* din celula-gazdă din competiția cu ARN viral pentru funcțiile ribozomale.

Aceasta ar fi de asemenea explicația faptului că perioada de latență a virusului *Sendai* se scurtează în prezența AM (123) pînă într-atît, încît virusul ar putea utiliza imediat ribozomii celulelor-gazdă fără interceptarea prealabilă a ARN-*m* din celula-gazdă în competiția pentru ribozomi. Creșterea virusului *Chickungunya* în culturile de celule de pui de găină poate fi de asemenea accentuată după tratament cu AM, probabil prin același mecanism. Producerea scăzută de interferon ar permite o mai puternică creștere a virusului (773).

Scanned with OKEN Scanner

Creşterea bacteriofagilor conţinînd ADN poate fi inhibată de AM, pentru că antibioticul se combină direct cu ADN viral.

Date asemănătoare cu cele relatate pentru AMD s-au obţinut şi cu mitomicină, care în concentraţii mari inhibează sinteza ARN din celula-gazdă, dar nu şi pe aceea a ARN viral (747). Însă, în timp ce mitomicina pare a afecta sinteza ARN prin distrugerea genelor sub al căror control se sintetizează diferitele specii celulare de ARN, AM pare a lăsa intact aparatul genetic, deoarece replicarea ADN nu este abolită, aşa cum reiese din studiile lui Nakata şi colab. (647), cu privire la acţiunea AM asupra reproducerii bacteriofagului T_2.

Investigaţii suplimentare privind efectele diferenţiate ale AM asupra virusurilor, în special asupra virusurilor tumorale, vor aduce fără îndoială date interesante; aceste date vor arunca o lumină nouă şi asupra naturii procesului biochimic care are ca expresie eliminarea organului transplantat.

c) **Alte efecte biochimice.** Deşi acţiunea primară a AM se exercită asupra sintezei ARN, celelalte efecte biochimice ale sale nu sînt neglijabile. Ele pot fi secundare efectului său asupra ARN (cum se întîmplă, de exemplu, în sinteza proteică) sau pot fi efecte directe, mai puţin importante decît inhibiţia sintezei ARN.

Actinomicina a fost folosită pentru a demonstra migrarea ARN din formaţiunile nucleare sintetizante în citoplasmă (301). Există însă şi date care arată că ea poate să şi inhibeze acest transfer (524), dar se pare că neconcordanţa dintre aceste cercetări este consecinţa unor diferenţe de metodă (371). Dezagregarea polizomilor după tratament cu AM a fost interpretată de Staehelin şi colab. (840) ca urmarea depleţiei de ARN-*m*. Totuşi. Acs şi colab. (2), folosind *Bacillus subtilis*, au demonstrat că AMD produce în mod evident depolimerizarea directă a ARN, deşi Darnell (195) a interpretat rezultate similare obţinute pe celule HeLa ca fiind consecinţa prezenţei unei categorii speciale de ARN-*m* cu *turnover* rapid şi, corespunzător, viaţă scurtă înainte de degradarea normală. Se presupune că depleţia ARN-*m* este cauza dispariţiei polizomilor (521, 522), dar nu există date suficiente care să certifice această presupunere. Formaţiunea ribozomică nucleară s-a dovedit a fi inhibată în mod remarcabil de către AM. Dacă formaţiunea ribozomică citoplasmatică este deprimată în mod egal de către AM, aceasta va reduce în mod adiţional polizomii. Cercetări recente asupra dezintegrării ADN, cînd sinteza proteinelor este blocată (172), sugerează că AM poate avea de asemenea acest efect indirect asupra ADN. Aceasta sprijină teoria conform căreia un suport proteic este necesar pentru a ţine ADN-templatul în poziţie funcţională şi confirmă încă o dată presupunerea că sinteza continuă a proteinelor este esenţială pentru menţinerea integrităţii celulare.

d) **Acţiunea actinomicinei asupra sistemului endocrin.** Actinomicina influenţează într-o măsură considerabilă calea efectorie a homeostaziei endocrino-metabolice (774). Această influenţă este legată de acţiunea ei asupra unor enzime sau sisteme enzimatice care mediază intervenţia hormonilor în metabolismele intermediare. Un grup major de hormoni este legat de anabolismul proteic. Civin şi Knox (160) au observat că hidrocortizonul activează pirolaza triptofanică şi au conchis că „hormonii sînt activatori primari ai enzimelor". Mecanismul sintezei proteinelor pe calea ARN-*m* nu era cunoscut pe atunci,

Scanned with OKEN Scanner

dar această generalizare a fost sprijinită în principiu de numeroşi cercetători. Astăzi se ştie că „hormonii acţionează prin înlesnirea producerii de ARN-*m*". Hormonii, pentru care s-a demonstrat legătura cu producerea de ARN şi/sau cu activarea enzimelor sînt: hormonul de creştere (STH) (187. 480—482, 875), corticoizii suprarenali (160, 338, 515, 801, 802, 935, 936, 954), ACTH (255, 256, 265, 485), hormonii estrogeni (320, 365, 673, 876, 913), testosteronul (320, 476, 526, 950), insulina (235, 484, 726, 769, 831) şi tiroxina (879). Se consideră că şi alţi hormoni ar putea acţiona pe calea ARN-*m*, dar dovada directă actuală în sprijinul acţiunii lor este încă incompletă. Printre aceştia au fost incluşi: hormonul tireostimulant (TSH) (240, 828), hormonul stimulant interstiţio-celular (ICSH) (360), hormonul foliculostimulant (FSH) (360), hormonul luteinizant, adenozin-3′, 5′-monofosfatul (AMP ciclic) şi hormonul paratiroidian (735, 736). De asemenea, în ultima grupă au fost încadrate auxinele vegetale şi anumiţi hormoni ai insectelor (163, 297).

Grupul de hormoni inhibaţi de actinomicină este în mod evident similar grupului de hormoni implicaţi în producerea ARN-*m*.

STH are implicaţii cunoscute în metabolismul proteic. Dacă se administrează la embrioni de găină, STH duce la creşterea în greutate şi la creşterea conţinutului de ADN şi ARN (187). Iniţial s-a considerat că STH reglează ritmul sintezei proteinelor, prin modificarea capacităţii ribozomilor de a asambla aminoacizi (experienţele au fost efectuate pe ficat de şobolan) (485). Ribozomii şobolanilor hipofizectomizaţi încorporează cu 50% mai puţin aminoacizi, în comparaţie cu animalele de control, în timp ce polizomii, deşi reduşi ca număr după hipofizectomie, prezintă un ritm normal de utilizare a aminoacizilor. Aceasta arată că la şobolanii hipofizectomizaţi se produce depleţia ARN-*m* necesară pentru agregare polizomică. Talwar şi colab. (875) au găsit că administrarea STH se asociază cu creşterea producerii de ARN şi că AM inhibează această creştere. Aceste fapte sprijină concluzia că STH controlează sinteza ARN-*m* (483).

Mai interesante pentru inducerea toleranţei faţă de un homotransplant sînt relaţiile dintre AM şi hormonii corticosuprarenali. Efectele stimulatoare ale glucocorticoizilor asupra sintezei ARN şi a proteinelor au fost demonstrate pe ficatul de şobolan (441). Triptofanpirolaza este activată atît de triptofan, cît şi de hidrocortizon (160), mecanismul de activare fiind însă diferit (337). Actinomicina inhibează complet activarea hormonală a acestei enzime, fără a afecta activarea sa de către substrat (338).

Administrarea glucocorticoizilor la şobolani duce la creşterea încorporării aminoacizilor în proteine, aşa cum se observă pe preparate hepatice acelulare, asociată cu intensificarea activităţii microzomale şi creşterea conţinutului microzomal de ARN şi proteine (515). Cortizolul s-a dovedit a stimula sinteza ARN-*m* în ficatul de şobolan (802). Weber şi colab. (936) explică sinteza enzimelor hepatice gluconeogenetice, indusă de cortizon pe această cale, de îndată ce AM inhibează puternic activitatea enzimatică. Astfel, activarea enzimelor gluconeogenetice poate fi calea primară prin care hormonii corticosteroizi stimulează gluconeogeneza. Activarea enzimatică prin cortizol a fost evidenţiată în timus şi tumori, ca şi în ficat (760). Aceste observaţii sînt însă în contradicţie cu alte observaţii, potrivit cărora încorporarea de aminoacizi şi meta-

Scanned with OKEN Scanner

bolismul glucidic în țesutul limfatic sînt inhibate de cortizol (752). Aceste neconcordanțe par a se datori specificității de răspuns al fiecărui țesut, dat fiind că s-au demonstrat și alte diferențe de răspuns biochimic între ficat și timus față de acțiunea unor hormoni.

Hidrocortizonul stimulează gluconeogeneza la șobolanii normali și la cei adrenalectomizați, chiar după administrarea AMD, sugerînd fie că acesta este un efect hidrocortizonic, care nu se conjugă cu creșterea activității enzimatice, fie că hidrocortizonul determină stimularea ARN-*m*. Ultima posibilitate a fost investigată de Smith și colab. (822), care nu au reușit să evidențieze alte modificări ale enzimelor activatoare ale aminoacizilor după tratament cu cortizon, în afara activării pirolazei triptofanice. Astfel, în timp ce efectele cortizonului asupra metabolismului proteic sînt în mod evident condiționate de un efector ARN-*m*, despre efectele sale asupra gluconeogenezei nu se cunosc suficiente amănunte.

Stimularea eliberării de hormoni corticoizi și a sintezei consecutive a ARN în ficat, prin tratament dietetic cu glicină, metionină și leucină, a fost demonstrată de Munro și colab. (639). Așadar, starea de nutriție a organismului este implicată în activitatea de sinteză a ARN și în balanța hormonală.

Planelles și colab. (714) au sugerat că blocada prin AM a acțiunii hormonilor corticosteroizi este determinată de acțiunea directă a acesteia asupra moleculei lor la nivelul grupărilor active. Ei au găsit o creștere de durată a concentrației 17-hidroxicorticosteroizilor în plasmă după tratament cu AM. Pentru apariția acestei creșteri, ei au făcut responsabilă interferența AM cu controlul normal de tip *feed back* al producerii steroizilor în glandele suprarenale.

De asemenea s-au publicat date care arată că AM inhibează efectul antinatriuretic al aldosteronului (954). Această acțiune inhibitoare asupra unei funcții fiziologice a hormonului pare a fi mult mai semnificativă decît alte date, conform cărora aldosteronul stimulează sinteza proteică în uterul de șoricioaică (534). Însă, ambele observații par a corespunde unui numitor comun, ARN-*m*.

Puromicina, un inhibitor al sintezei proteice cu implicații asemănătoare acelora ale AM în producerea de anticorpi (194), blochează și efectul steroidogenetic al ACTH, cînd se folosesc concentrații de antibiotic care inhibează sinteza proteică (266). Nu s-a obținut inhibiția prin puromicină a activării fosforilazei suprarenale indusă de ACTH, ceea ce a impus concluzia că sinteza proteică și nu activitatea fosforilazei suprarenale este legată cauzal de steroidogeneza crescută, determinată de ACTH (266). După tratament prelungit cu ACTH, la șobolan se observă o creștere paralelă a concentrațiilor de proteină și ARN în glanda suprarenală, cu o creștere ușor întîrziată a conținutului de ADN (255, 256). În aceeași condiție s-a evidențiat o puternică stimulare a încorporării aminoacizilor în proteinele suprarenalei (98). *In vitro* s-a stabilit că ribozomii glandelor suprarenale stimulate cu ACTH sînt mai activi în încorporarea glicinei, probabil ca urmare a creșterii conținutului și activității ARN ribozomal (255, 256). În contrast cu această ultimă observație, Halkerston și colab. (359), lucrînd pe suprarenale de șobolan, au găsit că ACTH inhibează captarea de glicină și au tras concluzia că între steroidogeneză și încorporarea de aminoacizi nu există o relație simplă. Se pare că ACTH acționează con-

Scanned with OKEN Scanner

comitent asupra steroidogenezei şi a sintezei proteice şi că între aceste acţiuni nu există un paralelism strict (332). Aceasta este numai o presupunere; modul precis de acţiune a ACTH nu este cunoscut încă. Efectul remarcabil al AMP ciclic de stimulare a producţiei de corticosteroizi şi inhibiţia posibilă a AMP ciclic prin AM sugerează că acesta poate fi mecanismul inhibiţiei ACTH prin acest antibiotic (774).

Există o evidenţă interesantă asupra acţiunii AM asupra altor hormoni, dar am insistat numai asupra relaţiilor sale cu hormonii corticosuprarenalei şi unii hormoni hipofizari, pentru implicaţiile pe care aceşti hormoni par a le avea în desfăşurarea proceselor care duc la eliminarea organului transplantat.

e) **Interacţiunea actinomicinelor cu radiaţiile ionizante şi agenţii alchilanţi.** Actinomicinele potenţează răspunsul organismului la radiaţii ionizante, aşa cum reiese din observaţii pe şoareci (339, 548), oameni (254, 527) sau culturi de ţesuturi de şoarece (246).

În general se poate afirma că aceste antibiotice au o acţiune similară nu numai cu aceea a radiaţiilor ionizante, ci şi cu aceea a agenţilor alchilanţi. Carcinogeneza şi mutageneza sînt considerate ca urmări ale acestor două categorii de agenţi. La şoarece s-a demonstrat că AM are efect carcinogenetic (164, 218), dar acest fapt nu este admis de toţi cercetătorii. Burdette (125) a evidenţiat, dimpotrivă, mai puţine mutaţii celulare după tratament cu AM, iar Steinman şi colab. (848) au prezentat date, potrivit cărora acţiunea mutagenică a $MnCl_2$ asupra culturilor de *Escherichia coli* este suprimată de AM. Nici Suzuki (866) n-a reuşit să evidenţieze acţiunea mutagenică a AM în experienţe pe *Drosophila melanogaster.*

Actinomicinele şi agenţii alchilanţi produc inhibiţia mitozelor în acelaşi mod ca şi razele Röntgen. Clinic au fost asociate actinomicina cu razele Röntgen (527) şi actinomicina cu azotiperita (675) şi au dat oarecare rezultate ca agenţi antitumorali şi imunosupresori. Actinomicinele au fost considerate ca avînd acţiune sinergică (339) sau adiţională (218, 527) cu radiaţiile ionizante în evocarea răspunsului tisular. Efectul AM de potenţare a răspunsului la radiaţii ionizante se poate datori inhibiţiei procesului de corectare a tulburărilor produse de radiaţii, cu toate că s-a stabilit recent că inhibitorii sintezei proteinelor şi aminoacizilor măresc ritmul recuperării tisulare după iradiere (51). Pe de altă parte, s-ar putea explica acţiunea sinergică a AM şi razelor Röntgen prin modelul interacţiunii agenţilor alchilanţi cu aceste raze.

Interacţiunea AM, azotiperitei şi a razelor Röntgen a fost folosită de Caspersson şi colab. (148) în explorarea citochimică a sistemului nucleol-ribozom. Modul interacţiunii acestor agenţi antitumorali şi imunosupresori rămîne încă un domeniu interesant de cercetare, dat fiind că în prezent dovezile faptice ale acestei interacţiuni nu pot fi puse de acord.

2. HORMONII CORTICOIZI

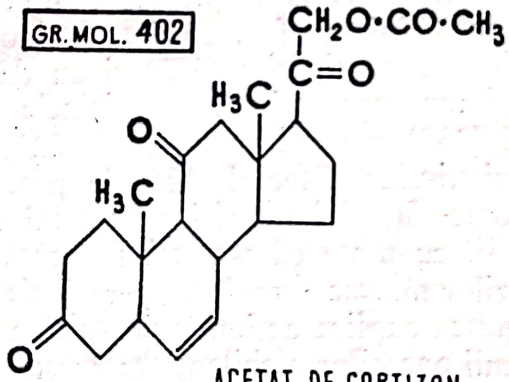
a) **Cortizonul.** Acest hormon deprimă formarea anticorpilor faţă de antigenele purificate (91, 677, 966) şi faţă de celulele heterologe de măduvă hematogenă (191) şi reduce titrul hemaglutininelor, indus de extractele de ţesut tumoral (453, 455). O asemenea scădere a titrului anticorpilor circulanţi ar fi favorabilă

Scanned with OKEN Scanner

și țesuturilor transplantate (894, 939). Cortizonul produce de asemenea distrugerea limfocitelor (409), atrofia nodulilor limfoizi (800, 857) și reducerea funcției fagocitare (666). Administrarea cortizonului prelungește de 3—4 ori supraviețuirea homografelor de piele la unele specii (81, 800). Acest hormon prelungește supraviețuirea homografelor de piele, chiar dacă se aplică numai grefei (82) sau numai donatorului (780). Δ_1-Cortizonul a fost utilizat la om pentru protejarea homotransplantelor de rinichi (493). Küss și colab. (493) l-au asociat în doze mari (40 mg/zi) cu 6-MP și iradierea locală, începînd din a 8-a săptămînă după transplantare și au obținut un efect spectaculos asupra volumului și funcțiilor rinichiului și asupra curbei termice a bolnavilor.

Billingham și colab. (81, 82) sînt de părere că mecanismul principal de acțiune a cortizonului în această circumstanță este mai curînd întîrzierea dezvoltării imunității decît prevenirea modificărilor locale ale homotransplantului inițiatoare a unui răspuns imunologic. Acest mecanism ar consta, deci, dintr-o inhibiție a captării de antigen și a fost descris numai în cazul cortizonului (61). După Kallis (453) și Šterzl (851), între mecanismul de acțiune a cortizonului și acela al antimetaboliților există similitudini marcate. Și unul și ceilalți acționează asupra fazei inductive a formării anticorpilor, au acțiune distructivă asupra țesutului limfoid și blochează formarea de anticorpi față de antigenele purificate în aceeași măsură. Asupra relațiilor dintre corticosteroizi și AM s-au prezentat amănunte în secțiunea precedentă.

Cortizolul nu pare a prelungi supraviețuirea homotransplantului renal la cîine (36) și nu s-a dovedit eficace nici într-unele dintre primele cazuri umane cu un asemenea transplant (613).



ACETAT DE CORTIZON

b) **Prednisolona.** Acest hormon are un efect supresor marcat asupra formării de anticorpi față de antigene purificate (856) și produce reducerea evidentă a splenomegaliei, observată în fenomenul Simonsen (931). Zukoski și colab. (980) au reușit să mențină viabil un rinichi homotransplantat la un cîine tratat cu prednisolonă (30 mg/kilocorp/zi), timp de 1 177 zile (fig. 93). Efectul prednisolonei nu pare a fi fost stimulat de o compatibilitate între donator și receptor, pentru că pe baze genetice s-a stabilit că această eventualitate este practic imposibilă (662) și pentru că donatorul devenit receptor al unui rinichi de la animalul sub tratament cu prednisolonă (homotransplantarea renală a fost încrucișată) a eliminat acest rinichi după 26 de zile. De altfel, efectul imuno-

Scanned with OKEN Scanner

supresor al prednisolonei a fost evidenţiat şi de Marchioro şi colab. (569) la cîine sau de alţi autori (321, 424, 845) în cazuri clinice, cînd ea a fost utilizată pentru a suprima reacţia imunitară de transplantare, care s-a dezvoltat în cursul terapiei cu azatioprină. În cursul tratamentului homotransplantului renal numai

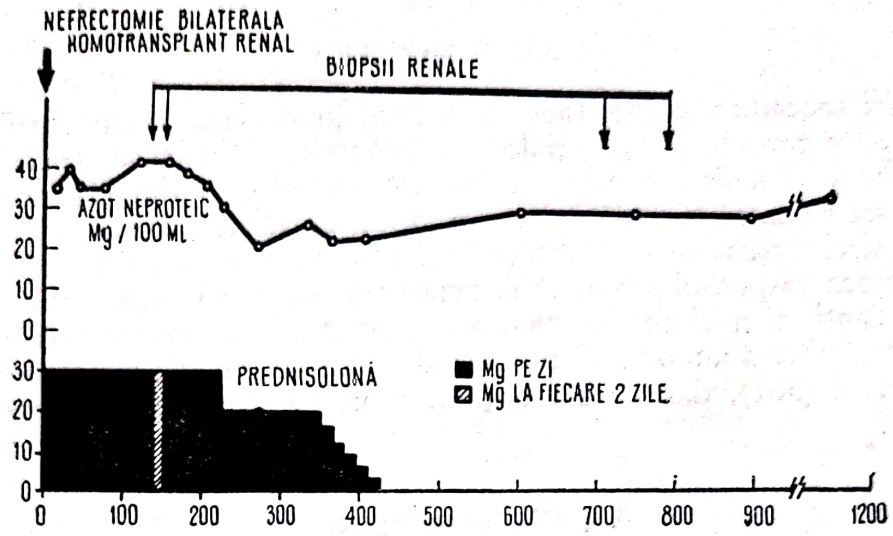


Fig. 93. — Evoluţia tratamentului şi a probelor biopsice la un cîine cu nefrectomie bilaterală şi homotransplant renal, tratat cu prednisolonă, care a supravieţuit 1 177 de zile [după Zukoski şi colab. (980)].

cu prednisolonă, organul pierde proteină şi dezvoltă leziuni nefritice, la fel cum se întîmplă în cursul tratamentului imunosupresor cu 6-metil-MP (981).

Mecanismul prin care prednisolona amînă eliminarea ţesuturilor homotransplantate cuprinde numeroşi factori, care, în general, sînt aceiaşi ca şi în cazul cortizonului. Prednisolona are un efect limfolitic marcat asupra arhitecturii unui nodul limfatic (931), dar efectul se şterge pe măsură ce tratamentul cu acest hormon corticosteroid se prelungeşte; în mod gradat, nodulul limfatic îşi recapătă arhitectura normală sub tratament cu prednisolonă (980). În cursul terapiei cu prednisolonă, rinichiul homotransplantat poate fi protejat printr-o reducere marcată a numărului de hemocitoblaşti formaţi (81).

c) **Aldosterona.** Todd şi colab. (892) au folosit aldosterona în scopul prelungirii supravieţuirii homografelor renale canine, dar rezultatele au fost puţin satisfăcătoare.

Hormonii corticoizi au fost incriminaţi în producerea unor embolii grăsoase sistemice după homotransplantarea rinichiului la oameni. Emboliile au fost detectate în pereţii alveolelor pulmonare, vasele cerebrale şi glomerulii rinichilor transplantaţi. În această ultimă împrejurare, globulele de grăsime pot fi evidenţiate în urină. De obicei, aceste accidente ale terapiei imunosupresoare cu hormoni corticosteroizi se însoţesc de creşterea nivelului trigliceridelor în plasmă (443).

Faţă de aceste observaţii se poate afirma că nu este exclus ca deteriorarea funcţiei renale, pneumonia, necroza osoasă şi leziunile ischemice viscerale care se manifestă clinic după transplantarea rinichiului să fie provocate de dozele mari de hormoni corticosteroizi folosiţi în vederea inducerii imunotoleranţei.

Scanned with OKEN Scanner

Ca atare, este mai prudent să se folosească doze moderate de asemenea hormoni şi să se reducă gradat aceste doze în cursul tratamentului imunosupresor.

Nicolau şi colab. (667) au folosit corticoterapia în condiţionarea donatorilor de măduvă hematogenă pentru homografe.

3. ACIZII NUCLEICI

Lucrări sporadice recente (560, 561, 563) preconizează activizarea investigaţiilor asupra capacităţii potenţiale a preparatelor de acizi nucleici, în special de acid ribonucleic, de a inhiba fenomenele imunologice din cursul transplantării. Această recomandare are în vedere faptul că acizii nucleici ar fi mai puţin distructivi decît radiaţiile sau substanţele citotoxice care sînt folosite în prezent pentru a bloca răspunsul imun. Pînă acum s-a reuşit prin tratament cu ARN, asociat cu cantităţi mici de ribonuclează, să se producă abolirea inhibiţiei reacţiei de „transferare a imunităţii" produsă de ARN extras din ganglionii limfatici ai donatorului (561), dar nu s-a obţinut inhibiţia eliminării homografelor de piele (560).

4. α_2-GLICOPROTEINELE

Fracţiunea serică bogată în α_2-glicoproteine s-a dovedit a inhiba în mod specific răspunsul imun la variaţi stimuli antigenici (633, 634). Un procent mare de iepuri trataţi cu fracţiunea α_2-glicoproteinică evidenţiază o reducere marcată a producţiei de anticorpi faţă de antigenele solubile, ca şi faţă de albumine, γ-globuline şi antigene insolubile (hematii) (633). De asemenea, Mowbray (633) a constatat o prelungire a supravieţuirii la peste 35% din homografele de piele făcute la şobolani proveniţi dintr-o colonie heterogenă, trataţi cu α_2-glicoproteine. Aceste experienţe nu au putut fi reproduse însă de Davis şi Boxer (207) care au lucrat în aceleaşi condiţii pe şoareci; nici răspunsul la homografa de piele şi nici producerea de hemaglutinine după administrarea de hematii nu au fost influenţate de fracţiunea α_2-globulinică, chiar dacă dozele au fost de 4—8 ori mai mari decît acelea care au efecte pozitive la şobolani şi iepuri. Această neconcordanţă de rezultate, care nu poate fi în mod sigur explicată prin lipsa de apropiere dintre aceste specii în scara animală, a suscitat ideea că acţiunea inhibitoare a α_2-globulinelor s-ar datori de fapt altor fracţiuni proteice serice, labile, care le însoţesc şi care nu sînt evidenţiabile (207). Mai probabilă este însă explicarea acestei neconcordanţe prin diferenţa de procedură experimentală la aceşti autori.

5. FENILALANINA

Nu a fost demonstrat încă efectul inhibitor al acestui aminoacid asupra formării anticorpilor în imunitatea de transplantare, dar există o serie de date care sugerează că el ar putea fi folosit în acest scop, cel puţin ca factor adjuvant.

Anticorpii fiind formaţi din stocul de aminoacizi liberi din celulă (961), orice factor în stare să modifice cantitativ sau calitativ acest stoc afectează produ-

Scanned with OKEN Scanner

cerea de anticorpi. Administrarea în exces a unui aminoacid unui animal cu o dietă adecvată produce tulburări în transportul altor aminoacizi în celulă şi, implicit, în stocul celular de aminoacizi. De exemplu, Neame (657) a constatat că fenilalanina interferează captarea *in vitro* a histidinei, argininei, ornitinei şi tirozinei de către ţesutul cerebral. Alte cercetări (156, 934) au arătat că acest tip de inhibiţie poate rezulta din suprasolicitarea unui transportor comun al anticorpilor în celulă. Un asemenea transportor saturat cu aminoacizi nu mai face faţă altor necesităţi de transport ale celulei normale. Ryan şi Carver (768) au constatat că excesul de l-fenilalanină produce o marcată inhibiţie a producerii de anticorpi împotriva toxoidului difteric la şobolani şi iepuri, iar Stavitsky şi Wolf (846) au stabilit că există o deosebită asemănare între sinteza proteinelor şi sinteza anticorpilor, ceea ce justifică presupunerea că fenilalanina inhibează producerea de anticorpi pe calea inhibiţiei sintezei proteinelor.

Acţiunea fenilalaninei asupra sintezei anticorpilor diferă însă de la o specie la alta: inhibiţia acestui proces este mai slabă la şobolani decît la iepuri (768).

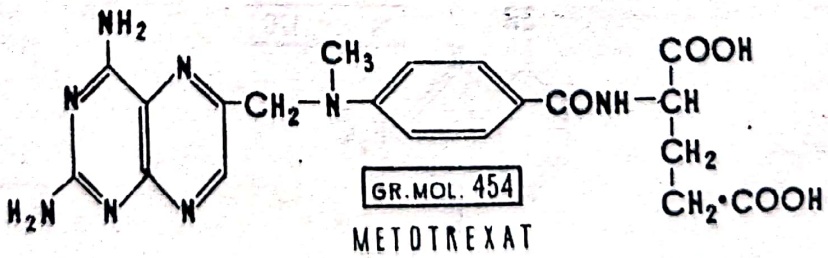
Metionina şi alţi aminoacizi nu au efect asupra sintezei anticorpilor (768), ceea ce arată că fenilalanina acţionează specific asupra acestui proces.

Un inhibitor specific al fenilalaninei, β_3-tienilalanina, produce o inhibiţie severă a formării anticorpilor la şobolani (960). Efectul său devine reversibil prin adaos de fenilalanină în hrana acestor animale.

Stavitsky şi Wolf (846) au demonstrat că anumiţi analogi ai aminoacizilor (*d*-etionină, acidul γ-etilamidoglutamic, *p*-fluorofenilalanina) inhibează în mod competitiv *in vitro* sinteza anticorpilor în ţesutul limfoid de iepure. Acest efect este înlăturat de analogul natural corespunzător.

6. ANALOGII AMINOACIZILOR

Magovern şi Yates (549), ca şi alţi autori (92, 93, 369), au folosit în scop imunosupresor acidul 4-amino-N_{10}-metilpteroilglutamic (metotrexat) în homotransplantarea plămînului la om. În cursul administrării sale s-a observat în sîngele periferic o limfopenie marcată, iar în măduva sternală un aspect hipocelular, cu un răspuns granulocitar redus şi plasmocitoză moderată. Această substanţă a fost folosită de asemenea cu rezultate încurajatoare, pentru protecţia homotransplantului renal (754), a homografelor de piele (250, 607, 918, 920), a homotransplantului cardiac (94).



METOTREXAT

Efectul imunosupresor al metotrexatului a fost descoperit de Uphoff (916), în 1958. Acest efect este condiţionat, în mod evident, de doză (389, 532).

Woodruff (968) a constatat că administrarea precoce a metotrexatului la șoarecii iradiați înlătură apariția bolii secundare după inocularea celulelor splenice omologe. La aceste animale s-a semnalat toleranța ulterioară față de homografe de piele cu aceeași proveniență ca și a celulelor splenice. Berenbaum (57) a arătat că doza unică de metotrexat are eficiența maximă dacă se administrează la 2 zile după injectarea antigenului. Hechtman și colab. (389) au folosit această substanță în perfuzii continue, cu efecte evidente asupra prelungirii supraviețuirii homografelor de piele, iar Thomas și colab. (886) au obținut rezultate similare la cîini cu homografe de măduvă hematogenă.

Toate cercetările menționate au scos în evidență două fapte și anume: a) prelungirea supraviețuirii homografelor după administrarea metotrexatului prezintă limite largi, probabil ca urmare a histocompatibilității diferite dintre donatori și receptori; b) supresiunea imunologică prin metotrexat se realizează numai dacă el se administrează înainte de a se fi definitivat perioada de inducție a formării anticorpilor.

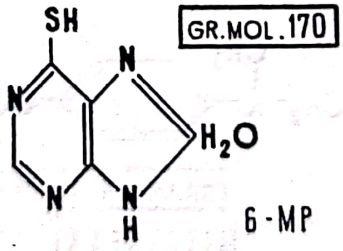
Diclormetotrexatul, un antimetabolit al acidului folic, este metabolizat de numeroase specii animale (678). Recent s-a observat că un sistem enzimatic localizat în fracțiunea solubilă hepatică (supernatantul centrifugat la 72 000×g) transformă diclormetotrexatul în 4-dezamino-4,7-dihidroxidiclormetotrexat (533), un metabolit de 1 000 de ori mai puțin activ în inhibarea reductazei folice (5). Efectele diclormetotrexatului asupra altor enzime sau sisteme enzimatice nu se cunosc, dar fără îndoială că el are implicații inhibitoare mai largi.

Un agent farmacodinamic ideal pentru tratamentul imunosupresor, ca de altfel și pentru tratamentul carcinostatic, trebuie să îndeplinească următoarele condiții: a) să prezinte acțiune selectivă pentru organul transplantat sau neoplazic; b) să fie metabolizat rapid de țesuturile normale pînă la forma cea mai puțin toxică; c) să nu fie metabolizat de organul transplantat sau de țesutul neoplazic (4).

Cel puțin pentru homotransplantul hepatic sau pentru tumorile hepatice, diclormetotrexatul pare să răspundă acestor deziderate (5).

7. MERCAPTOPURINA ȘI DERIVAȚII EI

a) **6-Mercaptopurina.** În cursul investigațiilor lor sistematice asupra antagoniștilor metabolismului acizilor nucleici, Elion și colab. (241) au găsit că substituirea unei grupări mercapto în poziția 6 a inelului purinic duce la apariția unui compus 6-mercaptopurina (6-MP), care are efectul remarcabil de a



suprima creșterea microbiană. Ulterior s-au făcut numeroase cercetări pentru a se cunoaște modul de acțiune a 6-MP, însumate în lucrări de sinteză de Mandel (559) și Handschumacher și Welch (367).

Zukoski şi Callaway (976) au prezentat o schemă ipotetică a acţiunii 6-MP, pe baza observaţiilor anterioare ale unor numeroşi autori. Potrivit acestei scheme, 6-MP inhibează faza inductivă a formării anticorpilor. Deşi această inhibiţie nu este completă, organul homotransplantat este în stare să reziste acestui răspuns sensibilizator (formării de anticorpi) minimalizat de 6-MP atît timp cît masa sa antigenică se află în afara unor tulburări funcţionale. Pe de altă parte, în prezenţa acestui antimetabolit, nu mai are loc inducţia sensibilizării celulelor limfoide. Aceste două circumstanţe permit integrarea homotransplantului în organism, a cărei perioadă critică durează aproximativ 6 luni.

Se pare că 6-MP îşi exercită acţiunea asupra celulelor proliferante, blocînd interconversiunea nucleotidelor (în particular transformarea acidului inozinic în acid adenilic), acest fapt fiind însă incomplet elucidat (206).

Efectul inhibitor al 6-MP asupra producerii de anticorpi a fost semnalat pentru prima dată într-un sistem în care animalul de experienţă a fost iepurele, iar antigenul serumalbumina bovină, administrată în doze mari, repetate (799). Aceste experienţe au demonstrat că momentul şi durata administrării substanţei sînt foarte importante pentru realizarea acestui efect. Pretratamentul sau tratamentul cu 6-MP început după declanşarea formării de anticorpi este ineficace, în timp ce tratamentul cu 6-MP, început o dată cu administrarea primei doze de antigen şi continuat timp de 21 de zile, suprimă complet producerea de anticorpi. Aceste experienţe iniţiale au fost extinse şi s-a putut stabili că 6-MP administrată la iepuri în doză de 6 mg/kilocorp/zi blochează răspunsul imun primar faţă de serumalbumina umană, dar are un efect redus asupra răspunsului imun secundar (798).

Alţi autori (850, 851, 852) au studiat efectele 6-MP asupra formării de anticorpi, folosind un sistem de transfer limfatic. Celule splenice provenind de la iepuri normali au fost incubate *in vitro* cu antigene din *Brucella suis* sau din *Salmonella paratyphi B* şi apoi au fost transferate unor iepuri tineri normali. Receptorii de celule splenice, care au fost trataţi cu 3—5 mg/kilocorp/zi, nu au format anticorpi, în timp ce receptorii de celule netrataţi au produs anticorpi. Totuşi, dacă celulele au fost obţinute de la donatori imunizaţi şi au fost tratate în mod asemănător, 6-MP nu a mai prevenit formarea de anticorpi la receptori, ceea ce a dus la concluzia că această substanţă este eficientă numai în cursul fazei inductive a formării de anticorpi. Aceste observaţii explică eşecul încercărilor iniţiale ale lui Šterzl (855) de a inhiba cu 6-MP formarea anticorpilor la iepuri adulţi şi răspunsul imun primar la iepuri tineri faţă de *Salmonella paratyphi B*. Această bacterie s-a dovedit a produce un răspuns imun secundar la iepurii adulţi şi un răspuns imun primar la iepurii tineri, reflectînd probabil consecinţa infecţiei naturale a iepurilor cu acest microorganism. Mai tîrziu s-a demonstrat că, spre deosebire de iradiaţie, dozele mari de 6-MP (18 mg/kilocorp/zi) ajung să blocheze răspunsul imun secundar faţă de serumalbumina bovină la iepure (504, 505). S-a dovedit de asemenea că dozele mari de 6-MP, administrate la iepuri care au fost inoculaţi în mod repetat cu cantităţi mari de serumalbumină bovină, pot opri producerea de anticorpi aflată în desfăşurare (170). Un alt efect al 6-MP asupra sistemelor imune este capacitatea sa de a produce o stare foarte asemănătoare toleranţei imunologice. S-a observat la iepuri inoculaţi cu serumalbumină umană şi trataţi ulterior cu

Scanned with OKEN Scanner

6-MP (6 mg/kilocorp/zi), timp de 2 săptămîni, că reinocularea lor după o lună cu serumalbumină umană, fără un nou tratament cu 6-MP, nu provoacă un răspuns imun şi că această lipsă de răspuns imun este evidentă chiar după o treia inoculare de serumalbumină umană la un interval de încă o lună. Iepurii netrataţi cu 6-MP dau răspuns primar, secundar şi terţiar la serumalbumină umană. Specificitatea stării de toleranţă este demonstrată de faptul că atît grupele de animale de control, cît şi grupele de animale tratate cu 6-MP formează anticorpi faţă de γ-globulina bovină, dacă aceasta este administrată cu a doua doză de serumalbumină, deci după tratamentul cu 6-MP (793). De asemenea s-a arătat că starea de toleranţă indusă de 6-MP poate fi desfiinţată prin inoculare de omogenate de splină omologă sau prin administrare de ADN extras din acelaşi fel de splină (791). Inducerea stării de toleranţă imunologică la iepuri faţă de serumalbumina umană prin tratament cu 6-MP este dependentă în mod remarcabil de doza de antigen: cu o doză constantă de 6-MP (10 mg/kilocorp/zi), aplicată timp de 2 săptămîni, numai dozele de antigen mai mici de 30 μgN nu ajung să inducă toleranţa imunologică (791). Importanţa intensităţii stimulului antigenic a fost semnalată şi în experienţe privind efectele 6-MP asupra reacţiilor imune la şoarece (655).

Neglijarea acestor factori este singura explicaţie a nereuşitei unor autori (303) de a induce toleranţa imunologică cu 6-MP.

6-MP suprimă o serie întreagă de răspunsuri imune (419, 677, 777, 796, 803). Această substanţă inhibează răspunsul imun faţă de virusuri la maimuţe (437) şi iepuri (165, 437), răspunsul imun faţă de hematii de oaie (655, 680) şi antigene bacteriene (56) la şoarece sau faţă de antigene tisulare provenind de la mamifere (268, 420, 889).

Efectul 6-MP, administrată zilnic intravenos înainte şi după inocularea la iepuri şi cobai a emulsiei de măduva spinării omologă şi de adjuvant Freund, de a reduce incidenţa paraliziei şi a encefalomielitei alergice experimentale, pe care aceste antigene o declanşează, a fost descris de Hoyer şi colab. (420). În acest caz, 6-MP nu previne complet accidentul imunologic, iar paralizia, alături de alte semne de boală, reapare după 7—10 zile de la întreruperea tratamentului cu acest drog (420). Chiar dacă tratamentul cu 6-MP este aplicat după 9—18 zile de la injecţia de emulsie de măduva spinării şi adjuvant Freund, cu doze mari de 6-MP (18 mg/kilocorp/zi), se poate obţine suprimarea encefalitei alergice experimentale. Totuşi, dacă paralizia a apărut, 6-MP rămîne fără efect (418). Field (268) a constatat chiar că 6-MP agravează accidentul imunologic la cobaiul inoculat cu antigen cerebral omolog, iar Thomson şi Austin (889) au confirmat observaţia ultimului autor, demonstrînd că nu există diferenţe între efectul asocierii antigen-6-MP şi efectul 6-MP asupra numărului leucocitelor neutrofile şi al limfocitelor periferice şi asupra instalării simptomatologiei encefalitice.

Efectele 6-MP asupra imunităţii de transplantare au fost de asemenea studiate pe larg. D'Angelo şi Chiovato (192) au folosit-o pentru inducerea imunotoleranţei în homotransplantul de măduvă hematogenă. Rubin şi Lewis (765) au demonstrat că un tratament cu 6-MP, timp de 2 săptămîni, poate induce o imunotoleranţă durabilă (peste 6—8 luni) faţă de homografele de piele la puii de găină, vîrsta receptorilor fiind în acest caz un factor critic. Schwartz

Scanned with OKEN Scanner

şi colab. (794, 799) şi Meecker şi colab. (610) au stabilit că timpul mediu de eliminare de tip *first set* a homografelor de piele la iepure ar putea fi triplat printr-o doză de 6-MP de 12 mg/kilocorp/zi şi că timpul de eliminare de tip *second set* a acestor grefe nu este influenţat de această substanţă. Nu s-a putut însă demonstra că 6-MP împiedică sau amînă eliminarea homografei de piele la şoarece (422, 609), şobolani şi cobai (422) sau a homografei pancreatice la

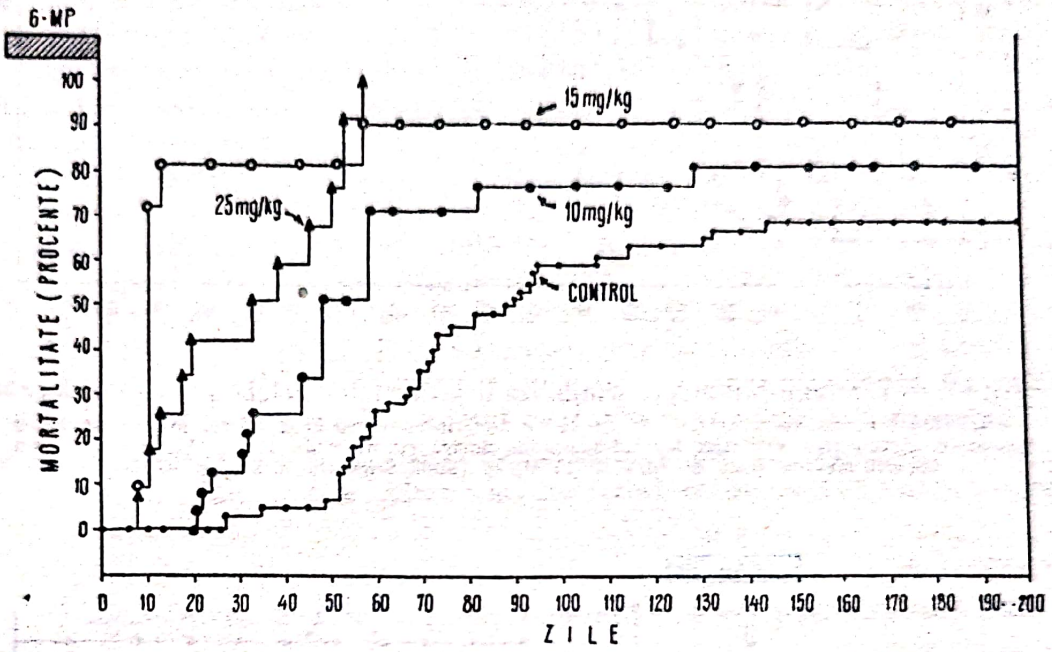


Fig. 94. — Efectul 6-MP asupra sensibilizării şoarecelui cu celule splenice omologe. Perioada de tratament de 3 săptămîni a început înaintea administrării celulelor parentale. Accelerarea evoluţiei bolii s-a produs la fiecare nivel de dozare [după Schwartz şi Beldotti (792)].

cîine (742). Cu ajutorul 6-MP s-a obţinut o prelungire semnificativă a supravieţuirii homografelor renale la cîine (136, 564, 656, 707, 982, 983, 985). Produsul metilat al 6-MP a permis de asemenea supravieţuirea homotransplantului renal la cîine cu 15 zile mai mult decît la lotul de control (976). Se citează chiar un caz în care rinichiul homotransplantat al unui cîine,căruia i se extirpează în prealabil rinichii proprii, nu a fost eliminat nici după 321 de zile, deşi tratamentul cu acest derivat al 6-MP fusese întrerupt cu 123 de zile înainte; biopsii renale repetate, ca şi investigaţii funcţionale repetate ale rinichiului homotransplantat nu au evidenţiat nici un semn de eliminare (976). În tabelul 46 se poate urmări eficienţa 6-MP asupra toleranţei homotransplantului renal la cîini. De asemenea s-a putut demonstra la şoareci că efectul imunologic al celulelor splenice omologe poate fi modificat prin tratament consecutiv al receptorului cu 6-MP; o singură doză de 150 mg/kilocorp, administrată receptorului, poate întîrzia eliminarea unui homotransplant tegumentar prelevat de la donatorul de celule splenice, dar nu poate asigura toleranţa imunologică (967). Într-o serie de experienţe interesante, Holecková şi colab. (413) au tratat o tulpină de şobolani, rezistenţi de obicei la transplantarea carcinomului Wal-

Scanned with OKEN Scanner

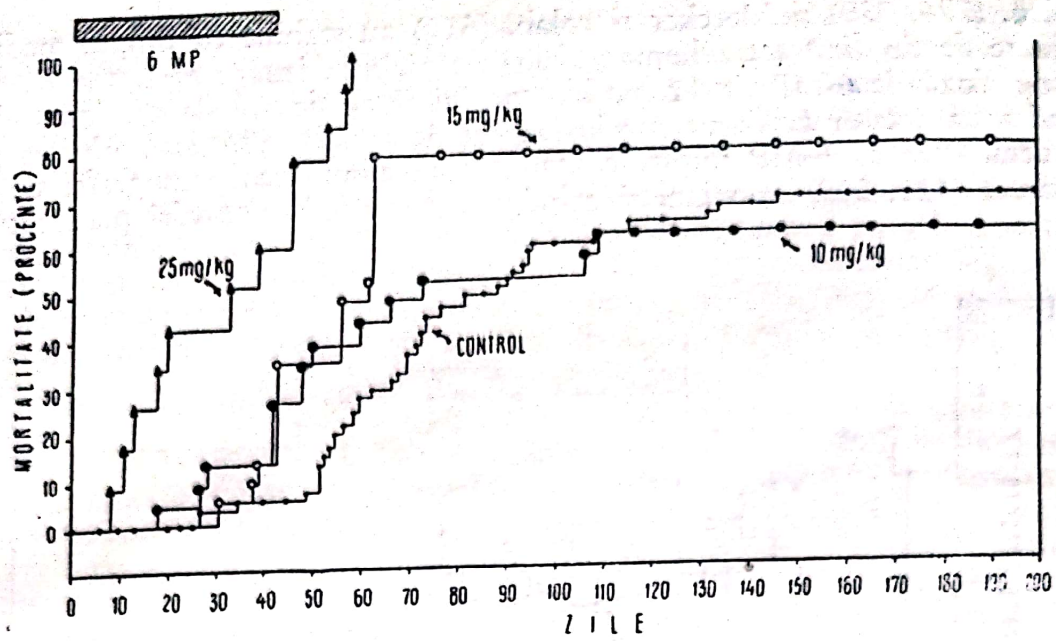


Fig. 95. — Efectul 6-MP asupra sensibilizării şoarecelui cu celule splenice omologe.
Medicamentul a fost administrat timp de 21 de zile, începînd cu ziua primei injecţii de celule parentale. Accelerarea evoluţiei bolii s-a produs numai cu doze de 15 şi 25 mg/kg; nu s-a obţinut nici un efect cu doza de 10 mg/kg [după Schwartz şi Beldotti (792)].

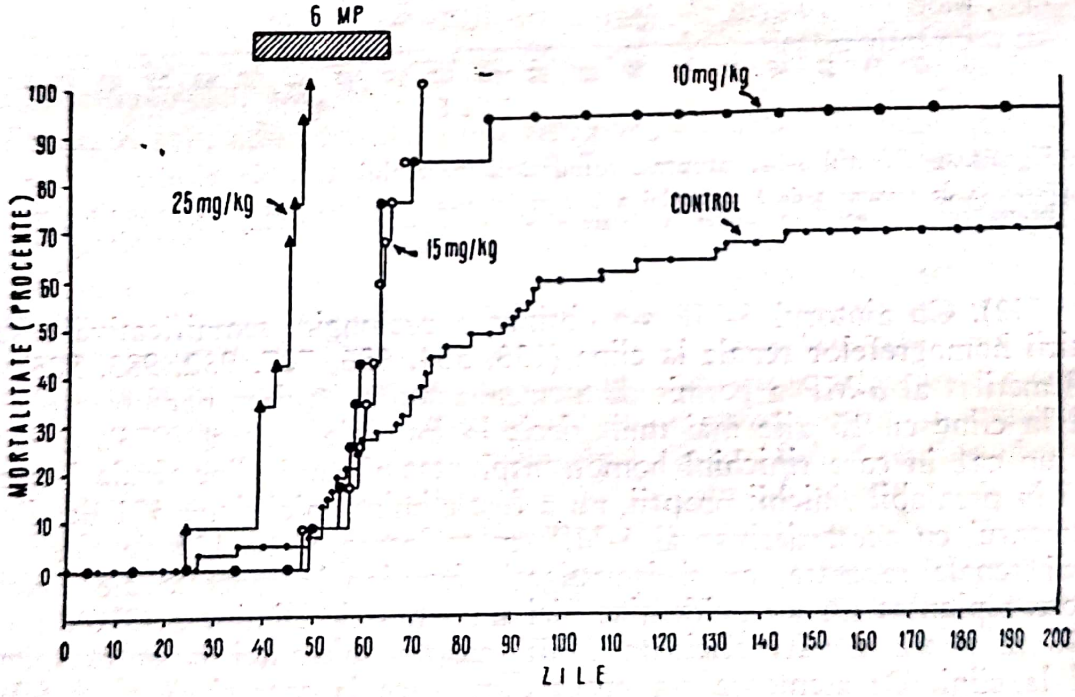


Fig. 96. — Efectul 6-MP asupra sensibilizării şoarecelui cu celule splenice omologe.
Administrarea medicamentului a început după o zi de la ultima injecţie de celule parentale. A se nota sensibilizarea gravă a şoarecelui în acest stadiu al reacţiei grefă-contra-gazdă la 6-MP [după Schwartz şi Beldotti (792)].

ker 256, cu 6-MP (12 mg/kilocorp/zi) şi au reuşit astfel să realizeze transplantarea acestei tumori, urmată de creşterea ei progresivă şi moartea receptorului, cu semne evidente de malignizare.

Scanned with OKEN Scanner

Schwartz şi Beldotti (792) au constatat însă că 6-MP accelerează mortalitatea şoarecilor sensibilizaţi cronic cu celule splenice omologe, fapt condiţionat în mai mare măsură de doză decît de modul de administrare a drogului (fig. 94, 95 şi 96). Răspunsul imunologic al animalelor tratate cu 6-MP faţă de antigenele tisulare este în funcţie de doză (119, 136, 601, 796).

Mecanismul de acţiune a 6-MP de blocare a răspunsurilor imune este aşadar puţin elucidat. Se pare că această substanţă nu acţionează prin blocarea sistemului reticulohistiocitar (797), nici prin modificarea modului de distrugere a antigenelor proteice *in vivo* (790). Efectele sale nu par a se datori leucopeniei sau inaniţiei, pentru următoarele motive: a) alţi agenţi farmacologici care prezintă o toxicitate mare şi produc leucopenie şi o pierdere severă în greutate nu au acţiune imunosupresoare la iepuri (22); b) iepurii ale căror sisteme imune sînt efectiv blocate de către 6-MP pot apărea perfect sănătoşi, fără pierdere semnificativă de greutate şi fără semne severe de mielotoxicitate (791); c) această substanţă nu produce tulburări însemnate ale componentelor proteice serice la iepurii normali sau imunizaţi (791). Aspectul curbei răspunsului biologic în corelaţie cu doza, descrisă de Schwartz şi colab. (798), sugerează că efectul 6-MP asupra formării de anticorpi s-ar datori mai curînd inhibiţiei unei reacţii chimice de prim ordin decît unei citotoxicităţi generalizate. Răspunsul sistemului limfoid al iepurelui în cursul evoluţiei favorabile a homografei de piele este atrofia limfoidă şi absenţa hemocitoblaştilor în ganglionii limfatici şi ţesutul splenic (22), aceste celule caracterizînd răspunsul sistemului limfoid la

Tabelul 46

Supravieţuirea cîinilor cu homotransplant renal sub tratament cu 6-MP *

Lotul experimental	Numărul cîinilor	Zile postoperator	
		Medie	Limite
Nefrectomie bilaterală	4	7,5**	7— 8
Nefrectomie bilaterală cu homotransplantarea rinichiului	10	15,0	9—25
Nefrectomie bilaterală cu homotransplantarea rinichiului; tratament cu 6-MP (5 mg/kilocorp/zi)	18	23,7***	12—66

* După Zukoski şi colab. (984).

** Dempster (213) a comunicat o supravieţuire medie de 7,8 zile.

*** Valoarea *p* mai mică decît 0,05, dacă se compară cu lotul cu nefrectomie bilaterală şi homotransplantare renală.

această specie faţă de homografa de piele (21). La iepurii care elimină homografele de piele în ciuda tratamentului continuu cu 6-MP s-a observat o proliferare explozivă a unor hemocitoblaşti foarte primitivi, care par a fi, deci, rezistenţi faţă de acţiunea acestei substanţe (22).

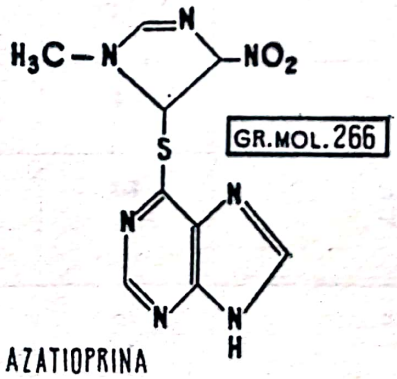
Scanned with OKEN Scanner

La cîine, 6-MP influenţează diviziunea rapidă a celulelor normale din măduva osoasă şi epiteliul intestinal şi a acelor celule din ganglionii limfatici care proliferează rapid, ca răspuns la incitaţiile antigenice ale oricărui homotransplant. Cercetări microscopice au arătat că prelungirea funcţiei homotransplantului renal canin la animalele tratate cu 6-MP evoluează paralel cu reducerea infiltraţiei interstiţiale cu celulele limfoide, care este intim legată de eliminarea de tip *first set* a organului (984). Potrivit observaţiilor lui Ortega şi colab. (682) şi Wissler şi colab. (959), 6-MP are şi la această specie o acţiune distructivă asupra centrilor germinali ai ganglionului limfatic. Acţiunea 6-MP nu se face evidentă însă asupra numărului de leucocite în sîngele periferic (422, 610).

Unele dintre efectele 6-MP ar putea fi puse pe seama unei acţiuni antiinflamatoare, dat fiind că pretratamentul iepurilor cu 6-MP, timp de 2 săptămîni, diminuează în mod remarcabil răspunsul inflamator, local, la o injecţie subcutanată de albuş de ou (0,1 ml dintr-o soluţie 10%) (698). Azotiperita, care produce o leucopenie de intensitate comparabilă cu aceea produsă de 6-MP, nu are efect asupra răspunsului inflamator (791).

La fel de puţin cunoscută este acţiunea 6-MP asupra bolii autoimune umane, cercetările în acest domeniu fiind foarte puţin concludente (189, 513, 795).

b) **Derivaţii 6-mercaptopurinei.** *Azatioprina (imuran, BW 57-322).* Această substanţă imunosupresoare, derivat imidazolic al 6-MP, cu structura chimică [6-(1-metil-4-nitro-5-imidazolil)-tiopurină], este un analog al hipoxantinei şi al bazei purinice adenina. Adenina este un constituient esenţial atît al ARN, cît şi al ADN. Azatioprina acţionează probabil prin intrarea sa în competiţie cu adenina şi hipoxantina în procesele metabolice (411).



AZATIOPRINA

Această substanţă a fost folosită pentru prima dată în scopul prelungirii viabilităţii unei homografe renale de către Calne şi Murray (144). S-a constatat ulterior că ea modifică de asemenea răspunsul imun la homografa pulmonară (43, 92), homografa hepatică (843), homografa splenică (570), homografa cardiacă (741), homografa arterială (922) şi homografa renală (162, 921). Astfel, supravieţuirea maximă a unei inimi homotransplantate la cîine, care a fost stabilită la 10 zile fără tratament imunosupresor, poate fi prelungită cu azatioprină pînă la 10 zile (fig. 97), criteriile de evaluare a supravieţuirii fiind modificările electrocardiografice şi de structură microscopică a grefei şi starea hemo-

Scanned with OKEN Scanner

dinamică a gazdei. Administrată postoperator în doză de 10 mg/kilocorp/zi, azatioprina restabilește nivelul de fond al unor indicatori umorali de suferință a homografei hepatice ortotopice (fig. 98), dar nu are același efect asupra homografei hepatice fără ablația ficatului autohton (fig. 99). Azatioprina nu prelun-

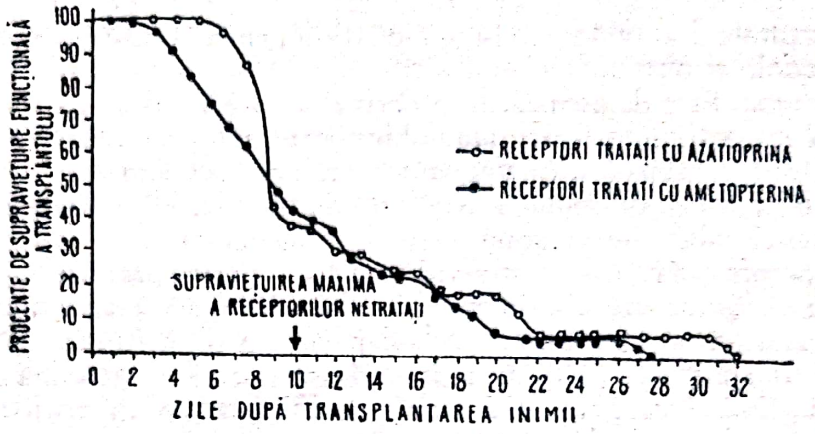


Fig. 97. — Durata supraviețuirii unor homotransplante de inimă la cîini, tratați cu azatioprină și ametopterină [după Reemtsma (741)].

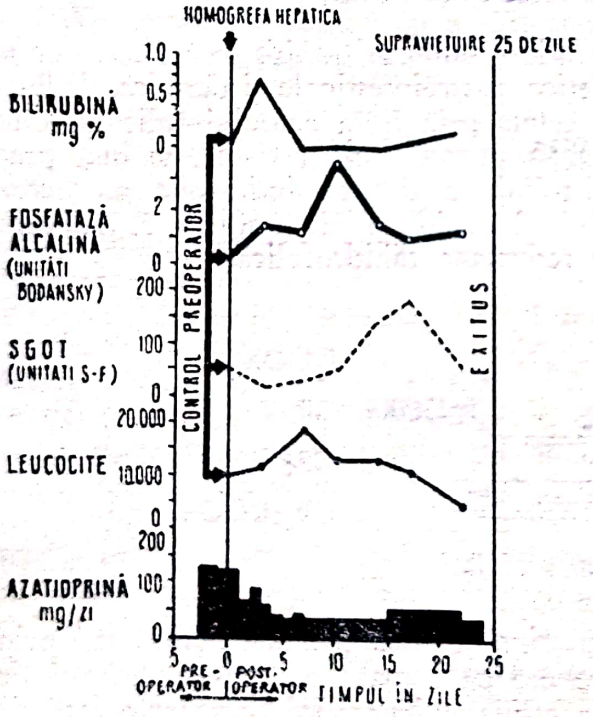


Fig. 98

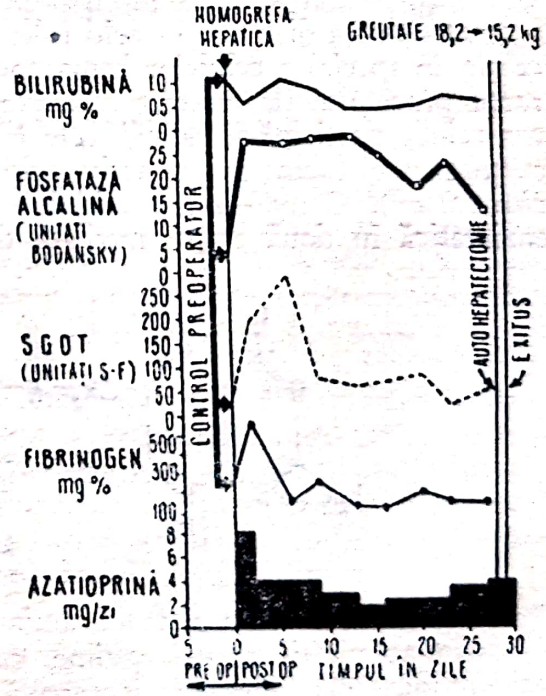


Fig. 99

Fig. 98. — Evoluția unor indicatori umorali de rejecție a homotransplantului hepatic ortotopic la un cîine hepatectomizat [după Starzl și colab. (843)].

Fig. 99. — Modificări biochimice observate la cîini cu homotransplant hepatic heterotopic, fără ablația ficatului autohton.

Creșterea nivelului plasmatic al fosfatazei alcaline și al transaminazei glutamicoxalacetice tinde să fie mai mare decît aceea observată la cîini hepatectomizați cu homotransplant hepatic ortotopic (fig. 98). A se nota creșterea concentrației de fibrinogen în plasmă în perioada postoperatorie inițială [după Starzl și colab. (843)].

geşte supravieţuirea homotransplantului pancreatic (742). Această substanţă deprimă titrul anticorpilor circulanţi şi reacţia de fixare a complementului în prezenţa fracţiunilor microzomale din limfocitele splenice ale receptorilor de homotransplante, aşa cum s-a putut dovedi la cîini cu homotransplant renal (957).

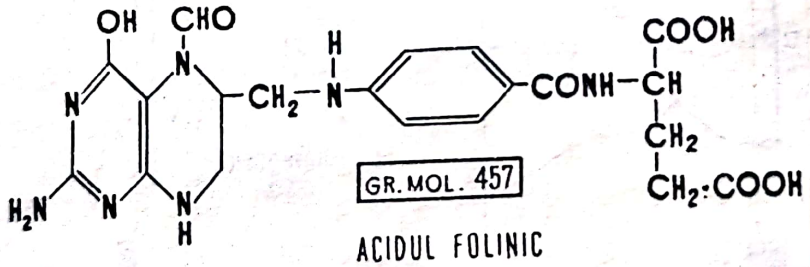
Cu rezultate inferioare acelora ale azatioprinei a fost folosită în homografele arteriale şi azaserina (922).

Tioguanina. Este de asemenea un derivat al 6-MP, asupra căruia cercetările în legătură cu activitatea sa imunoinhibitoare sînt mai reduse. Dameshek şi Schwartz (189) au constatat că tioguanina are un efect similar cu acela al 6-MP în anemia hemolitică autoimună. Nu sînt disponibile, în prezent, date privind acţiunea acestei substanţe în imunitatea de transplantare.

8-Azaguanina. Acest derivat s-a dovedit a suprima producerea de anticorpi *in vivo* şi *in vitro*. Astfel, Malmgren şi colab. (556, 557) au demonstrat că la şobolanii trataţi cu acest compus scade capacitatea de a forma aglutinine anti-oaie, iar Dutton şi colab. (230) au arătat că adaosul de azaguanină la mediul de incubaţie suprimă încorporarea *in vitro* a ^{14}C-leucinei în anticorpii care se formează în celulele splenice.

8. ANTAGONIŞTII ACIDULUI FOLIC

Deficienţa dietetică în acid folic produce tulburări rapide în creşterea unor celule, în special a celulelor hematopoietice, gastrointestinale şi dermice. Tulburarea procesului de creştere a acestor celule prin lipsa acidului folic nu este consecinţa participării sale directe la acest proces. Acidul folic este însă precursorul unui factor foarte activ, acidul folinic (acidul tetrahidrofolic sau *factor citrovorum*). Conversiunea acidului folic în acid folinic implică o reducere enzimatică în două etape, mediată de reductaza dihidrofolică.



ACIDUL FOLINIC

Antagoniştii acidului folic, aminopterina şi ametopterina, acţionează prin blocarea activităţii acestei enzime, care are ca urmare privaţiunea celulei de acid folinic (663). Rezistenţa crescută a celulelor leucemice de şoarece faţă de ametopterină este consecinţa capacităţii lor de a produce cantităţi mari de reductază dihidrofolică, suficiente pentru a depăşi acţiunea inhibitoare a acestei substanţe (624).

Rolul acidului folic în sinteza anticorpilor a fost dovedit pentru prima dată de Little şi colab. (531), care au constatat că lipsa acidului folic determină la păsări deficienţa producerii de aglutinine în titru corespunzător faţă de *Salmonella typhosa* şi scăderea rezistenţei lor faţă de infecţii produse de o serie

de microorganisme, printre care și virusul *Newcastle*. Ulterior, Sommers și colab. (827) au arătat că incidența paraliziei poliomielitice este triplată la șoareci prin tratament cu aminopterină și au pus acest efect pe seama distrugerii țesutului limfoid. Într-o serie largă de cercetări (348, 349, 518, 525, 720) s-a demonstrat de asemenea că ametopterina suprimă reacția limfocitară provocată de virusul coriomeningitei limfocitare, fără a preveni însă viremia, și că acest efect poate fi redus prin administrarea unei combinații de purine și pirimidine.

Antagoniștii acidului folic previn unele manifestări ale hipersensibilizării de tip întîrziat a cobailor față de bacilii tuberculoși (725) și față de toxoidul difteric și ovalbumină (288) și par a reduce o serie de simptome ale unor boli autoimune umane (343).

Ametopterina s-a dovedit a avea efect protector asupra șoarecilor (916) și cîinilor (885) inoculați cu măduvă hematogenă omologă după iradiere totală. Producerea imunotoleranței față de homografe tumorale la șoareci prin administrarea ametopterinei a fost demonstrată de Uphoff (919), de Humphreys și colab. (429) și de Molomut (630) în cîteva sisteme experimentale foarte concludente.

Ametopterina poate prelungi supraviețuirea transplantului de inimă de la 10 la 27 de zile (fig. 101).

Asupra metotrexatului și a diclormetotrexatului s-au prezentat amănunte în altă secțiune a acestui capitol.

9. DERIVAȚII ACIDULUI CAPROIC

Acidul ε-acetamidocaproic a fost încercat ca agent imunosupresor de Bertelli și colab. (66, 67), care au obținut prelungirea supraviețuirii homotransplantului renal la cîini tratați cu acest drog. Gillette și colab. (298, 300) și Cramer și colab. (175), folosind un alt derivat al acidului caproic, acidul ε-aminocaproic, au obținut efecte similare asupra homografei de piele și au pus acest efect pe seama acțiunii sale antiproteolitice, asimilîndu-l cu efectul altor inhibitori enzimatici (cum ar fi factorul antitripsinic din soia), care sînt de asemenea în stare să atenueze evoluția procesului de eliminare a homografelor de piele normală sau a homotransplantului tumoral (300). Zukoski și colab. (987) sînt de părere că acidul ε-aminocaproic inhibează conversiunea proesterazei componentei C_1 a complementului în forma sa activă. Acești autori au confirmat eficiența sa în prelungirea supraviețuirii homotransplantului renal la cîine.

Se susține că derivatul acetamidic al acidului caproic este cel puțin la fel de eficient ca și 6-MP (66), observație care conferă enzimelor proteolitice un rol deosebit în procesul de eliminare a organelor și țesuturilor transplantate. Se poate presupune că enzimele proteolitice intervin numai în faza imediat premergătoare eliminării țesutului homotransplantat, alterînd proteinele antigenice care circulă de la acest țesut la nodulii limfatici regionali. Nu este exclus ca această alterare enzimatică a antigenului să fie necesară, pentru ca el să poată fi absorbit de către limfocite. Dacă antigenul se află într-o formă „neasimilabilă", limfocitele rămîn nereactive. Însă, de îndată ce limfocitele au fost sensibilizate, enzimele proteolitice nu mai au nici o funcție în eliminarea țesutului sau orga-

Scanned with OKEN Scanner

nului transplantat. Aşa s-ar explica, de exemplu, lipsa efectului acidului ε-aminocaproic asupra eliminării unei homografe secundare de piele (300).

Acidul ε-acetamidocaproic are efecte toxice hepatice, splenice şi renale, pe care nu le are acidul ε-aminocaproic (175).

Analogii acidului caproic au de asemenea efect anticomplementar, suprimă fenomenul Schwartzman şi stimulează activitatea secretoare a glandelor suprarenale (175).

10. DIVERŞI ALCALOIZI

a) **Rezerpina.** Injecţii repetate de rezerpină (1 mg/kilocorp/zi, timp de 12—18 zile) produc o severă atrofie a timusului la şobolanii adulţi şi reduc atît capacitatea lor de a elimina homografele de piele, cît şi de a răspunde prin reacţii de hipersensibilizare întîrziată. Activitatea hemaglutinoformatoare este de asemenea deprimată de rezerpină. Acţiunea acestei substanţe asupra proceselor imune este corelată fie cu acţiunea sa asupra funcţiei hipofizoadenocorticale, fie cu acţiunea sa de depleţie a stocurilor de serotonină (227).

b) **Alcaloizii din Vinca rosea.** Lucrări cuprinzătoare privind acţiunea alcaloizilor din *Vinca rosea* asupra sintezei acizilor nucleici şi a sintezei proteinelor au publicat recent Johnson şi colab. (442) şi Creasey şi Markiw (178). Informaţiile acestor autori sugerează posibilitatea de a-i folosi ca substanţe imunosupresoare.

11. AGENŢII ALCHILANŢI

Acţiunea vezicantă bine cunoscută a azotiperitei a dus în primul rînd la folosirea ei ca substanţă chimică de luptă în primul război mondial. Examinarea *post mortem* a victimelor intoxicaţiei cu azotiperită a arătat că această substanţă are o acţiune citotoxică puternică, care se exercită în special asupra ţesutului hematopoietic (489). S-a socotit că efectele sale se datoresc în primul rînd eliberării intracelulare de acid clorhidric, dar astăzi se admite că ea suferă în celulă o ciclizare intramoleculară care duce la formarea de cationi puternic încărcaţi electric. Aceşti cationi sînt foarte reactivi şi se pot combina cu numeroşi constituenţi celulari, nucleoproteinele fiind cel mai probabil loc de acţiune intracelulară a acestora. Studii asupra sintezei acizilor nucleici în prezenţa azotiperitei sugerează că ea acţionează direct asupra dezoxiribozidelor, avînd ca urmare oprirea mitozelor (316). Alte cercetări au arătat că această substanţă şi substanţele similare produc legături încrucişate în interiorul moleculelor sau între moleculele de proteine sau moleculele de ADN, cu tulburarea funcţională consecutivă a acestor componente celulare esenţiale (839). Similitudinea dintre acţiunile biologice ale agenţilor alchilanţi şi ale radiaţiei ionizante explică o expresie de uz comun şi anume „radiomimetismul" acestor substanţe.

Primele lucrări privind efectul agenţilor citotoxici asupra producerii de anticorpi au fost efectuate de Hektoen (395). Acest autor a demonstrat că azotiperita deprimă formarea anticorpilor faţă de hematii de oaie la iepure cînd se administrează fie cu 4 zile înainte, fie simultan cu antigenul. Dacă administrarea substanţei se face la 4 zile după injectarea antigenului, formarea anticorpilor

Scanned with OKEN Scanner

este mai puțin afectată. Efecte similare au fost observate și la cîini cărora li s-au administrat hematii de oaie sau de șobolan. Deși producerea de anticorpi este deprimată în mod considerabil, această depresiune nu rămîne permanentă și, în 2—3 săptămîni, apar în sîngele animalelor astfel tratate anticorpi în titru progresiv. Aceste observații de bază au fost confirmate în decursul timpului și de alți cercetători (703, 838, 872).

Interesul pentru agenții alchilanți s-a menținut între cele două războaie mondiale și a fost foarte suscitat în timpul celui de al doilea război mondial. După descoperirea unor noi asemenea agenți au fost efectuate studii suplimentare privind efectele lor asupra răspunsurilor imunologice. Astfel s-a demonstrat că tris-(β-cloretil)-amina deprimă răspunsurile anamnestice ale caprei la proteina vegetală asemănătoare albuminei extrasă din uleiul de ricin (703). În experiențele care au dus la această observație, caprele au fost injectate cu această proteină, ceea ce a provocat apariția răspunsului imun primar. Cînd precipitinele antiricină nu au mai fost prezente în sîngele lor, s-a administrat agentul alchilant pînă la punctul în care s-a obținut leucopenia. O a doua injecție de proteină ricinică a fost urmată de apariția întîrziată în sînge a unor titruri mici de anticorpi. Ulterior s-a arătat că agenții alchilanți deprimă producerea aglutininelor tifoide la iepure (838) și că suprimă imunitatea față de paraziții malariei la puii de găină (872). Azotiperita nu are nici un efect cînd se administrează după ce procesul imunologic împotriva parazitului *Plasmodium lophure* a atins un anumit grad, dar activitatea paraziticidă a puilor de găină este deprimată în mod evident (fapt dovedit prin creșterea parazitemiei), cînd este administrată înainte sau chiar în cursul infectării lor cu acest parazit (838, 872). S-a stabilit că efectul antiimun principal al agenților alchilanți este întîrzierea apariției titrului maxim de anticorpi (334, 395). Cea mai mare întîrziere s-a semnalat la acei iepuri la care administrarea lor s-a făcut cu 24—48 de ore înainte de administrarea antigenului (*Salmonella typhi H*), dar nu s-a obținut nici un efect cînd s-au administrat la 48 de ore după administrarea acestuia (334). Aceste observații impun concluzia că substanțele de acest fel nu suprimă, în sens absolut, formarea anticorpilor. Alte observații, care au demonstrat existența infecției naturale a iepurilor cu *Salmonella typhi H* (850), par a limita efectul antiimun al agenților alchilanți numai la răspunsurile imune secundare, nu și la cele primare.

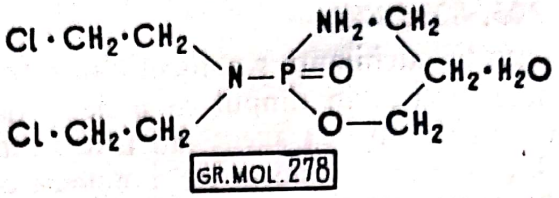
Fenomenul Arthus și alte reacții vasculare, descrise la iepurii tratați intravenos cu ser de cal, sînt împiedicate să apară de către azotiperită (la fel ca și formarea anticorpilor de care depind aceste reacții) (122). De asemenea, arterita indusă prin injectarea la iepuri într-o doză unică a unei mari cantități de ser bovin, albumină sau γ-globulină bovină este suprimată de către azotiperită (789).

Un alt agent alchilant puternic, trietilenmelamina (TEM), s-a dovedit a avea aceeași acțiune ca și azotiperita: inhibează răspunsurile secundare ale iepurilor față de hematiile de oaie, dar nu are nici un efect asupra răspunsului imun primar la acest antigen (116). Novaembichina [2-cloropropil-bis-(2-cloroetil)-amina] întîrzie la iepuri apariția anticorpilor față de hematii de oaie, cînd se administrează în doză unică, mare, imediat înaintea injectării antige-

Scanned with OKEN Scanner

nului; administrarea repetată a acestei substanţe în doze moderate (0,2 mg/kilocorp) nu afectează producerea de anticorpi (772).

Ciclofosfamida (endoxan, citoxin) are un efect supresor relativ asupra răspunsului imun faţă de homotransplant la iepure (445), şoarece (62, 282,



CICLOFOSFAMIDA

864) şi cîine (739), iar la cobai inhibează în mod deosebit producerea de anticorpi şi inducerea hipersensibilizării întîrziate (566, 904), dar nu prelungeşte supravieţuirea homografei de piele la această specie, dacă se utilizează doze subletale (60). O doză zilnică de 10 mg/kilocorp nu are efect semnificativ asupra supravieţuirii homografei de piele, deşi produce o mortalitate de 18%, iar o doză de 20—25 mg/kilocorp împiedică eliminarea obişnuită a acesteia, dar produce o mortalitate de 94—100% (tabelul 47).

Tabelul 47

Efectul ciclofosfamidei asupra timpului de supravieţuire a homografei de piele la cobai *

Doza	Numărul de animale	Timpul de supravieţuire a homografei (zile)		P
		Media	Limite	
Control	17	12,5	<10—27	
10 mg/kilocorp	17	13,2	<10—28	0,26
20 mg/kilocorp	17	17,5	<10—28	0,0022
Control	9	14,4	<10—27	
25 mg/kilocorp	9	22,2	14—32	0,027

* După Berenbaum (60).

Aminoclorambucil, un alt agent alchilant, sintetizat de Davis şi colab. (209), are o acţiune profund distructivă asupra măduvei osoase şi a nodulilor limfatici la şobolan (211, 249) şi iepuri (179), fiind în acelaşi timp lipsit în mod evident de efecte toxice asupra altor organe şi ţesuturi. Aceste efecte selective ale aminoclorambucilului au făcut posibilă homotransplantarea măduvei osoase cu succes la iepuri (179). Datele lui Zukoski şi colab. (984) şi Cree şi colab. (180) au dovedit că la cîine, aminoclorambucilul nu oferă însă nici un fel de protecţie împotriva eliminării homotransplantului renal. Primii autori au raportat o medie de supravieţuire a rinichiului transplantat de 15 zile, iar cei din urmă de 14 zile, necondiţionată de schema de tratament cu aminoclorambucil.

Studiile asupra acţiunii imunosupresoare a agenţilor alchilanţi sînt foarte numeroase (1, 36, 38, 147, 153, 460, 520, 591, 602, 683, 723, 942, 943).

Scanned with OKEN Scanner

Lucrări recente interesante asupra mecanismului biochimic de acţiune a agenţilor alchilanţi au publicat Brookes şi Lawley (120), Golder şi colab. (308) şi Goldstein şi Rutman (313).

12. ALŢI ANTIMETABOLIŢI

a) **Aminouracilul.** Denumit mai corect *5*-bis-(*2*-cloretil)-aminouracil, a fost introdus încă din 1958 în tratamentul leucemiilor cronice de către Lyttle şi Petering (542, 543), dovedindu-se util şi lipsit de efecte neplăcute la bolnavii cu această boală (951). Buskirk şi colab. (133) au arătat că aminouracilul deprimă producţia de anticorpi umorali la şobolan şi şoarece, iar Nelson şi Bridges (660) au demonstrat protecţia pe care el o conferă împotriva eliminării homografelor de piele. Pe acelaşi model experimental pe care Schwartz şi Dameshek (794) au testat proprietăţile imunosupresoare ale 6-MP, aceşti autori (660) au stabilit că timpul de eliminare poate fi prelungit de aminouracil cu aproape 50% (tabelul 48). Nu este încă stabilit dacă aceste rezultate obţinute

Tabelul 48

Eliminarea homografelor de piele la iepurii cu aminouracil *

Grupul de animale	Nr. animale	Doza de aminouracil (mg/kilo-corp/zi)	Eliminarea primară a grefei		Eliminarea secundară a grefei		Efecte toxice
			Media timpului de eliminare (zile)	Limite (zile)	Media timpului de eliminare (zile)	Limite (zile)	
1 (control)	25	—	9,1	7—13	6,0	5—8	—
2	9	0,1	14,6	14—17	6,1	4—8	Nici un efect
3	9	0,2	13,8	10—16	6,7	6—8	Leucopenie moderată (3 000—4 000 mm³)
4	10	0,5 (14 zile)	17,8	10—22	—	—	Pancitopenie severă, diaree, mortalitate de 90% înainte de eliminarea homografei de piele

* După Nelson şi Bridges (660).

pe animale au un corespondent satisfăcător în împiedicarea eliminării ţesuturilor sau organelor transplantate la om. Dat fiind că această substanţă s-a dovedit lipsită de efecte neplăcute la om, ea ar putea fi încercată şi ca agent imunosupresor în cazul transplantării organelor şi ţesuturilor.

Aminouracilul şi un alt derivat asemănător, care se deosebeşte de acesta numai prin prezenţa unui grup metil (507, 508), se bucură de interesul cercetătorilor, pentru că ele combină posibilităţile de a acţiona asupra metabolismului proteic atît ca analogii pirimidinici, cît şi ca azotiperita. Aceste două substanţe inhibează încorporarea unor aminoacizi (*l*-lizină-6-C^{14}, acid *l*-glutinic-C^{14} şi glutamină-C^{14}) în proteinele nucleare hepatice acidosolubile (126, 132).

Scanned with OKEN Scanner

b) **Bromdezoxiuridina.** Acest antimetabolit este un compus pirimidinic. În experienţe în care s-a urmărit *in vitro* ritmul sintezei anticorpilor în celule splenice izolate de la iepuri la 2 zile după un stimul anamnestic *in vivo*, s-a constatat că 5-bromouracildezoxiriboza, un inhibitor specific al metabolismului ADN, produce depresiunea acestei sinteze (231, 674). Acest efect nu se datoreşte inhibiţiei anticorpilor *per se* de către 5-bromouracildezoxiriboză, ci interferenţei sale cu un stadiu iniţial de dezvoltare a sintezei de anticorpi, dat fiind că substanţa are efect numai dacă se administrează o dată cu declanşarea acestui proces şi nu are efect dacă se administrează cînd procesul a atins un nivel important.

c) **Uretanul.** Această substanţă a fost utilizată ca agent imunosupresor de către Coppola şi colab. (173), care au studiat efectul său asupra homotransplantului renal la cîine, fără a se putea evidenţia efecte deosebite în acest caz.

d) **Cloramfenicolul.** Acţiunea acestei substanţe asupra sintezei acizilor nucleici şi a sintezei proteinelor a făcut obiectul unor lucrări interesante (937), care au înscris-o între substanţele imunosupresoare. Datele privind acest aspect al activităţii sale nu sînt însă concludente.

13. SUPRIMAREA RĂSPUNSULUI IMUN PRIN COMBINAŢII DE SUBSTANŢE IMUNOSUPRESOARE

Există în prezent date experimentale interesante, potrivit cărora combinaţiile de antimetaboliţi, care interesează procese biochimice în relaţii de secvenţialitate sau concomitenţă, se potenţează *in vitro* (245, 407, 408) şi *in vivo* (242). Luînd în considerare aceste date şi folosind testul de hemaglutinare pentru evaluarea eficienţei tratamentului imunosupresor (655), Bieber şi colab. (68) au încercat efectul combinării derivaţilor purinici cu analogi pirimidinici asupra răspunsului imun. Ei au constatat că asocierea 6-MP cu 5-bromdezoxiuridină în cantităţi egale, cuprinse între 10 şi 25 mg/kilocorp, produce o scădere a răspunsului imun mai însemnată decît aceea obţinută cu doze de 3 ori mai mari din fiecare dintre aceste substanţe, folosite separat. Potenţarea acţiunii este mai puţin importantă atunci cînd se asociază 6-MP cu 5-acetoxiuracilul sau 6-azauracilul şi uretanul (tabelul 49). Trebuie remarcat faptul că imuranul nu este potenţat de 5-bromdezoxiuridină.

Hoehn (411) a folosit o serie de combinaţii de medicamente (bromdezoxiuridina cu tioguanina, AMC cu imuran etc.), pe care alţi autori le-au utilizat separat, pentru a inhiba eliminarea homotransplantului renal (11, 136, 137, 140, 142) sau a altor ţesuturi şi organe transplantate (390, 689, 742, 891) şi a constatat că asocierea tioguaninei cu bromdezoxipiridina este promiţătoare ca efect asupra procesului de eliminare a homografei de piele şi mai aceptabilă ca risc în comparaţie cu alte asocieri medicamentoase. Tioguanina este de asemenea potenţată de 4-tiodezoxiuridină, dar atît aceasta, cît şi 5-bromdezoxiuridina o potenţează într-o măsură mai puţin importantă decît este potenţată 6-MP. O oarecare potenţare s-a obţinut şi între 6-azauracil şi uretan, inhibitori ai sintezei pirimidinelor (241, 245), dar numai în combinaţii cu doze medii de uretan. Uretanul în doze mari micşorează eficacitatea asocierii medicamentoase (68).

5-bromdezoxiuridina a fost utilizată pentru interceptarea răspunsului imun şi în alte sisteme (231, 674).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 49

Indicii de anticorpi obţinuţi după tratament cu 6-MP în asociaţie cu alte substanţe *

Substanţa asociată	Doza substanţei asociate (mg/kilocorp)	6-MP (mg/kilocorp)			
		0	8,33	25	75
5-Bromo-dezoxiuridină	0	1,00	0,90	0,52	0,32
	3	0,88	0,63	0,30	0,34
	10	0,62	0,46	0,28	0,16
	30	0,37	0,43	0,25	0,09
5-Acetoxiuracil	0	1,00	0,91	0,61	0,51
	33,3	0,75	0,65	0,52	0,45
	100	0,57	0,46	0,34	0,30
Azauracil+ uretan	0	1,00	0,74	0,57	0,48
	17+ 8	0,64	0,62	0,57	0,32
	50+25	0,57	0,55	0,38	0,28
	150+75	0,37	0,46	0,42	0,21

* După Bieber şi colab. (68).

Combinaţia dintre imuran şi azotiperită, încercată de Cockett şi colab. (166), nu oferă avantaje mai mari decît utilizarea azatioprinei ca atare şi aceiaşi lucru se poate afirma şi despre asocierea 6-MP cu alte cîteva substanţe imunosupresoare (709), dar combinaţia azatioprină-prednisonă-AMC s-a dovedit eficace în tratamentul homografelor renale umane recoltate de la cadavre (635).

Pe baza unor observaţii de mai sus se poate trage concluzia că potenţarea maximă a efectului imunosupresor se obţine prin asocierea unui antagonist pirimidinic cu un antagonist purinic. Aşadar, inhibiţia cea mai puternică a răspunsului imun se realizează atunci cînd se blochează concomitent ambele căi, purinică şi pirimidinică, ale biosintezei acizilor nucleici.

Beneficiul acestor asocieri de substanţe este dublu: pe de o parte se îmbunătăţeşte indicele terapeutic, iar pe de altă parte se pot reduce dozele fiecărei substanţe din combinaţie, fără a se micşora efectul. Acest fapt a fost verificat în cazul transplantării rinichiului sau a pielii (139, 600, 920) şi în boala autoimună (188, 189).

II. *SUPRIMAREA RĂSPUNSULUI IMUN PRIN AGENŢI FIZICI*

1. IRADIAŢIA

a) **Efectul imunosupresor al iradierii.** Efectul iradierii asupra imunităţii a stîrnit interes încă din momentul în care Benjamin şi Sluka (54) şi Hektoen (393, 394), cu 50 de ani în urmă au publicat observaţiile lor asupra acestui efect. Modificarea răspunsului imun prin iradiaţie este condiţionată în mare măsură de doza de radiaţii, durata şi modul aplicării lor şi starea fiziologică a organismului în momentul iradierii (26, 27, 162, 171, 219, 226, 258, 302, 358, 378, 446, 474, 554, 646, 814, 873, 953).

Tabelul 50

Nocivitatea radiaţiilor şi eficienţa lor asupra prelungirii timpului de supravieţuire a organelor sau ţesuturilor homotransplantate

Specia	Tratament		Letalitatea (%)	Timpul de supravieţuire a grefei în zile (cu limite sau D.S.)		Referinţe
	Doza (r)	Zile înaintea transplantării		Control	Animale tratate	
Şoarece	450	4—5	—	11(8—13)	22,4(17—27)	Medawar (607)
	500	1	—	14	18(15—30)	Cole şi Davis (168)
	670	1	—	12,6±0,8	23,2±2,4	Tyan şi Cole (905)
	670	1	—	10,1±1,5	22,5±2,8	Tyan şi Cole (905)
	400	0	—	13(11—16)	20(14—41)*	Piomelli şi colab. (713)
	450	4—5	—	17,7(11—35)	53(11—100)*	Medawar (607)
	500	2	—	16	52*	Davis şi Cole (208)
Iepure	250	1	12	9(6—14)	12,7(6—24)	Dempster şi colab. (215)
	400	1	9	7,5(6—8)	12,6(7—50)	Brooke (118)
	900	2—3	67	9,5(6—16)	—	Kent (463)
	1 000	2—3	97	9,5(6—16)	—(>30—>104)	Kent (463)
Cîine	150	1	—	4,4(1—10)	—(1—6)**	Dempster (213)
	225	1—7	11	3(1—5)	4(2—8)**	Baker şi Gordon (315)
	600	—	100	—	—	Hume şi colab. (423)
	1 000	—	100	Reacţia homografei la 3 din 3 cîini morţi în 5—10 zile		Idem
	1 200	—	100	Reacţia homografei la 3 din 6 cîini morţi în 5—8 zile **		Idem

* Fără incompatibilitate de *locus* H-2.

** Homotransplant renal.

Consecinţele iradierii totale a organismului, bine cunoscute la numeroase specii animale (15, 32, 33, 46, 118, 161, 168, 208, 215, 229, 247, 342, 404, 463, 539, 607, 713, 849, 858, 905, 906), nu au făcut obiectul studiilor pe om decît în momentul în care s-au întîmplat iradieri accidentale (319, 436, 468, 584, 586, 697, 862) sau au fost necesare iradieri deliberate, fie în vederea condiţionării unui receptor uman pentru o homo- sau heterografă, fie în vederea tratamentului unor afecţiuni neoplazice sau imunologice (14, 495—497, 535, 536, 585, 587, 637, 699, 861, 870, 901, 902). Folosirea radiaţiilor pentru prelungirea supravieţuirii unei homografe (tabelul 50) este relativ recentă şi a fost stimulată iniţial de observaţiile lui Dempster şi colab. (215) şi Billingham şi colab. (81), care au arătat că razele Röntgen şi cortizonul întîrzie eliminarea homografelor de piele la iepuri.

Aceste consecinţe sînt diferite, după cum doza de radiaţii este unică şi totală, sau este fracţionată şi aplicată în mod repetat, şi constau în aplazia celulelor hematopoietice cu răsunet asupra elementelor figurate ale sîngelui periferic, tulburări de hemostază, tulburări ale metabolismului proteic, tulburări digestive, tulburări genitale şi leziuni anatomohistologice ale tuturor ţesuturilor

Scanned with OKEN Scanner

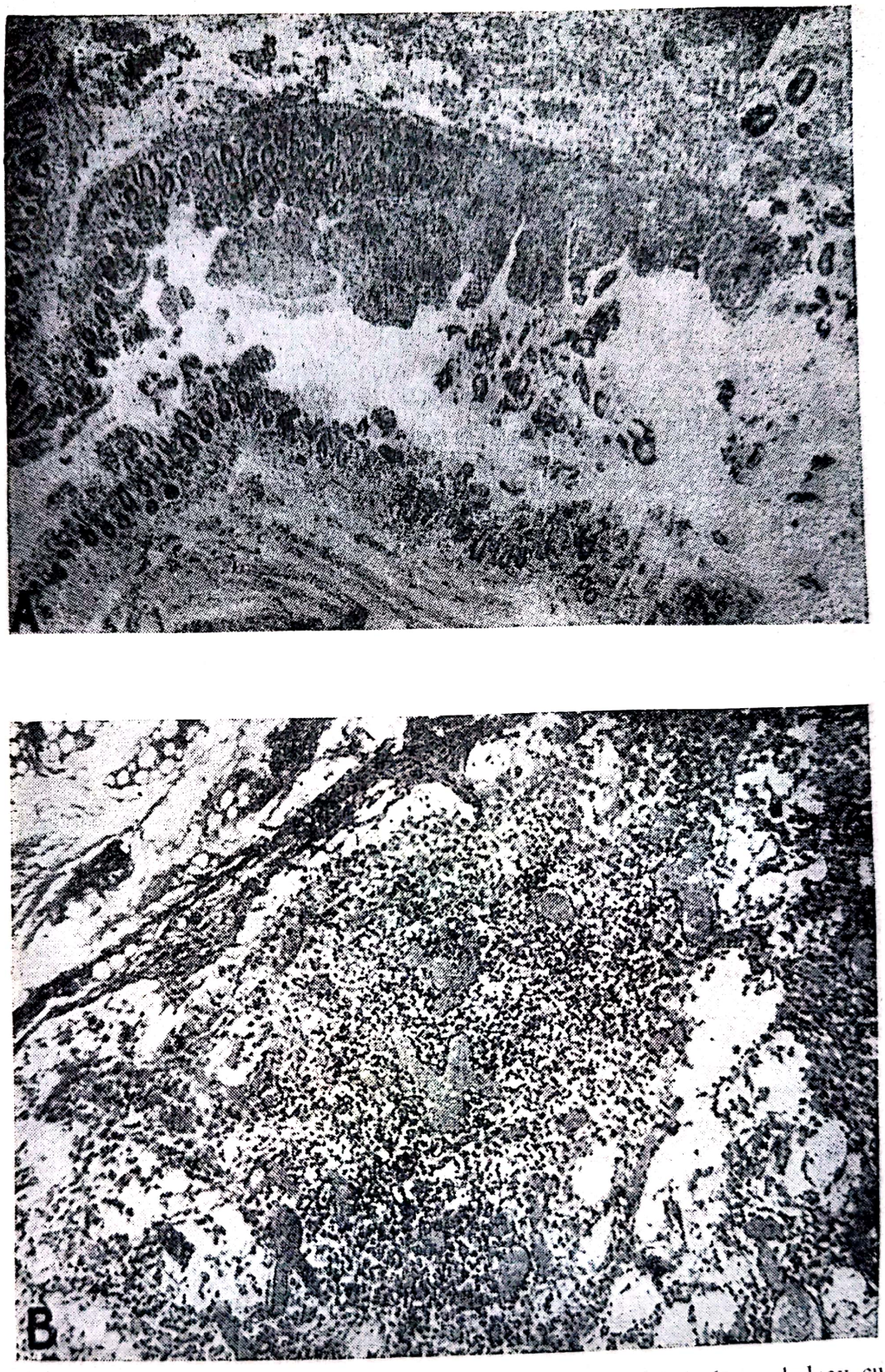


Fig. 100. — Aspecte histologice ale unor organe provenind de la un bolnav cu homotransplant renal iradiat (600 r).

A — mucoasă intestinală la nivelul unei perforaţii intestinale (a se remarca intensitatea redusă a reacţiei inflamatoare); *B* — ganglioni limfatici (a se nota aplazia foliculilor limfoizi);

Scanned with OKEN Scanner

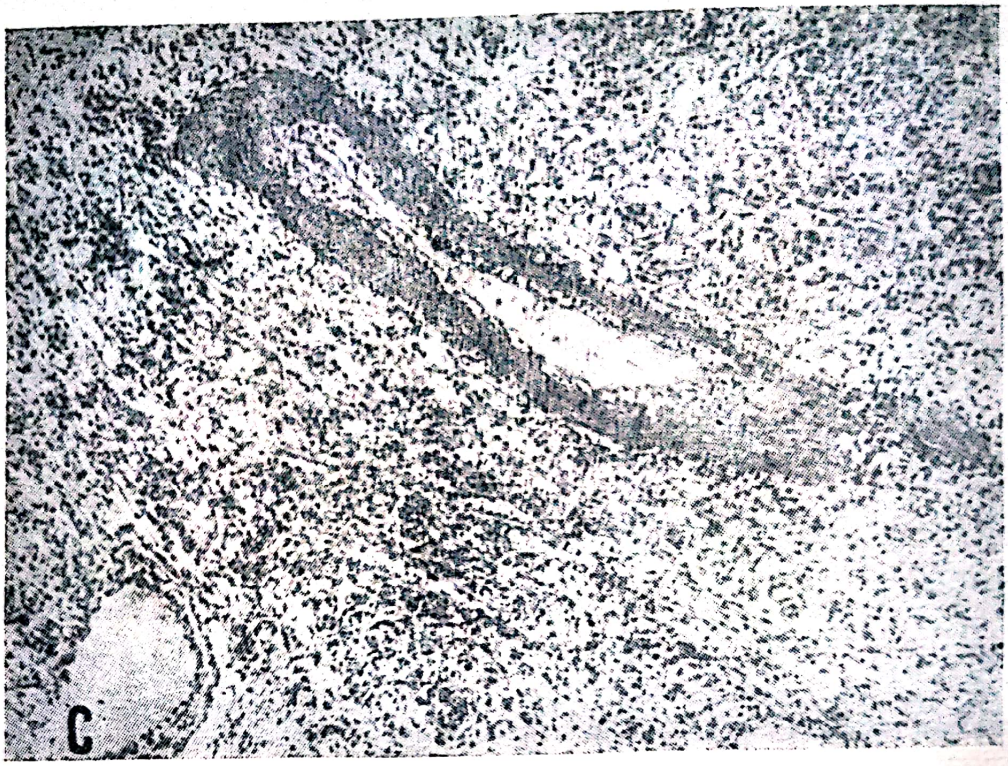
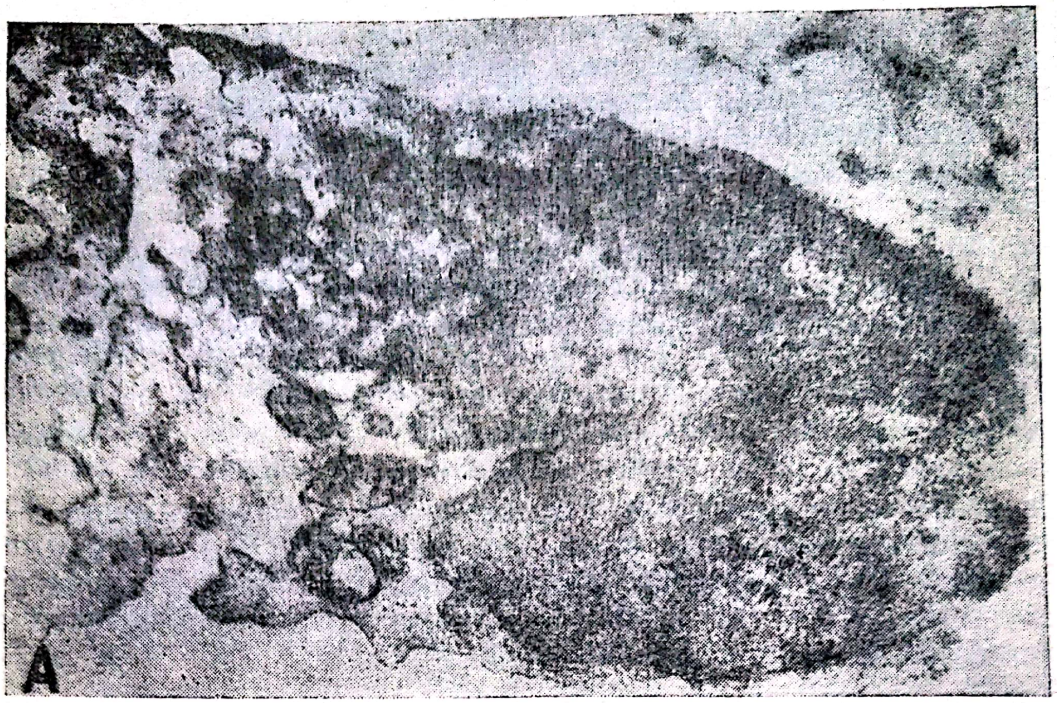


Fig. 100. — Aspecte histologice ale unor organe provenind de la un bolnav cu homotransplant renal iradiat (600 r).

C — splină (a se nota aplazia limfoidă); *D* — măduvă osoasă (a se nota aplazia mieloidă [după Küss şi colab. (495)].

Scanned with OKEN Scanner



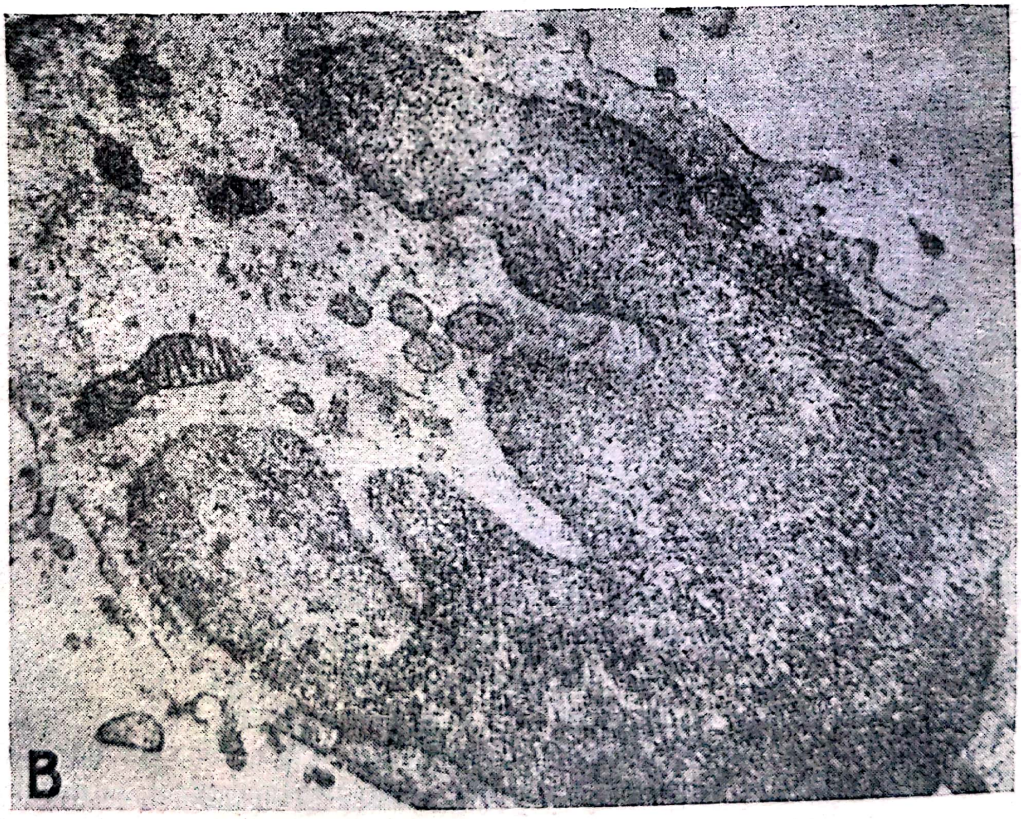


Fig. 101. — Aspecte electronooptice ale celulelor hiperbazofile (histiocite cu aspect plasmocitoid), evidențiate după homotransplantarea unui rinichi (sub iradiere și tratament cu 6-MP) în măduva osoasă (A) și organul transplantat (B) [după Binet și colab. (90)].

Scanned with OKEN Scanner

(fig. 100 *A—D*). În măduva osoasă și splină apar numeroase celule hiperbazofile cu aspect plasmocitoid, care evocă mai curînd reacția organismului la acțiunea țesutului transplantat decît consecința iradierii însăși (fig. 101 *A—B*). Asupra acestor consecințe se va insista numai în măsura în care ele contribuie la delimitarea sub aspect teoretic sau practic a modificării răspunsului imun prin iradiație.

Iradierea subletală anulează sau deprimă în mod deosebit capacitatea iepurilor de a realiza un răspuns imunologic secundar la γ-globulină bovină (718, 719), această incapacitate de răspuns întinzîndu-se pe o perioadă mai mare de 24 de săptămîni (719). Akoev și Lagun (8) au subliniat faptul că scăderea rezistenței imunobiologice poate fi manifestarea unei componente ireversibile a acțiunii radiațiilor. Celada și Machinodan (150) au demonstrat pe celule izolate afectarea capacității lor de a sintetiza anticorpi prin expunere la radiații.

De asemenea, iradierea globală cu raze Röntgen reduce incidența și gravitatea efectelor encefalomielitice alergice ale inoculării de țesut cerebral omolog la cobai (269, 871) și severitatea hipersensibilizării întîrziate la toxoid difteric la același animal (909) sau sensibilizarea cutanată la tuberculină după administrarea de bacili tuberculoși omorîți (186, 434).

După doze subletale de radiații, homotransplantul splenic la cîine are totuși un efect defavorabil asupra tulburărilor elementelor figurate din sîngele periferic și asupra supraviețuirii animalului, în timp ce inocularea unor celule splenice omologe după iradiere cu aceleași doze nu are un asemenea efect (448, 528). Invers, la șoarece, celulele splenice omologe injectate intravenos după iradiere cu doze subletale au efecte nefavorabile asupra animalului (433, 551, 618). Aceste observații ilustrează faptul că specia condiționează consecințele iradierii totale a organismului cu doze subletale de radiații.

Pe de altă parte, expunerea la radiație reduce antigenicitatea a numeroase tipuri de celule (599).

Studiind corelația dintre răspunsul celular și imun la antigene și factorii mai sus menționați, care condiționează acest răspuns după iradiere, Speirs (834) a găsit că dozele mari de iradiații aplicate înainte de administrarea antigenului reduc numărul de celule capabile de răspuns imun și inhibează puternic formarea de anticorpi și că la animalele restabilite după iradiație, producția de anticorpi pare a reflecta capacitatea de răspuns a leucocitelor și, în special, a eozinofilelor. Aceste celule par a juca un rol intermediar în procesele celulare care duc la producția de anticorpi. Jordan și colab. (448) au constatat că administrarea intravenoasă la cîine, a celulelor splenice sau a extractelor splenice acelulare omologe, după iradierea întregului organism cu doze letale, duce la moartea animalelor prin depresiune a activității măduvei osoase, fără să existe vreo diferență în evoluția clinică a tulburărilor hematologice la aceste animale și la animalele de control, care au primit doze similare de radiații și că, dimpotrivă, administrarea celulelor splenice autologe, ca și a celulelor măduvei osoase autologe (447), protejează animalele față de aceste doze de radiații. Friedman (287) a demonstrat că administrarea unei doze imunizante de antigen solubil extras din diverse tulpini de *Shigella* la șoareci iradiați, cu sau fără transplant de măduvă osoasă, suprimă formarea de aglutinine anti-*Shigella* pentru o perioadă de 1—2 săptămîni. Umnova și Noviková (914, 915) au

Scanned with OKEN Scanner

constatat că în condiţiile transplantării măduvei hematogene după iradierea organismului apar anticorpi incompleţi. Observaţiile lui Tubiana (900) la om sînt concordante cu observaţiile efectuate pe animale. Acest autor a urmărit variaţiile numărului de granulocite la balnavi cu insuficienţă renală care au fost iradiaţi total înainte de transplantare de rinichi şi a constatat că momentul restabilirii numărului de granulocite după iradiere coincide de cele mai multe ori cu momentul apariţiei semnelor de eliminare a transplantului.

Alte cercetări au arătat, fără vreo îndoială, că şoareci iradiaţi letal pot fi recuperaţi prin implantarea intravenoasă a unor celule hematopoietice de la şoareci normali, fenomen explicat prin repopularea gazdei cu celulele injectate (280, 589); aceste cercetări au permis totodată să se stabilească şi condiţiile în care fenomenul repopulării celulare hematopoietice a gazdei este posibil (44, 327). Starea de imunitate nu este însă abolită de iradiaţie, dat fiind că recuperarea animalelor care au fost imunizate în prealabil cu antigenul respectiv nu se poate obţine (327). În acest ultim caz se pot discuta următoarele ipoteze: fie că celulele din măduva osoasă injectate sînt distruse de anticorpii circulanţi din serul gazdei, fie că ele sînt obiectul unui răspuns imun celular din partea unor celule radiorezistente sensibilizate, fie că ele sînt atacate pe amîndouă aceste căi. În ceea ce priveşte homografele de piele, se ştie că răspunsul imun faţă de ele suferă în primul rînd o mediaţie celulară (72, 75, 78) şi nu se ştie precis dacă anticorpii umorali, care se pot forma (18), joacă vreun rol în eliminarea unor asemenea homografe. Pe de altă parte s-a stabilit că împotriva unor tumori (mai ales limfoame), anticorpii umorali sînt în mod indubitabil activi atît *in vitro*, cît şi *in vivo* (326).

În experienţele lor, efectuate în scopul de a vedea dacă distrugerea celulelor de măduvă osoasă injectate la şoareci preimunizaţi iradiaţi se datoreşte unei reacţii umorale sau unei reacţii mediate de elemente celulare, Loutit şi Micklem (537) au stabilit o serie de fapte foarte interesante şi anume: a) repopularea celulară şi recuperarea şoarecilor iradiaţi cu celule de măduvă osoasă străină este împiedicată, dacă receptorul a fost imunizat împotriva izoantigenelor corespunzătoare, fără ca fenomenul să fie dependent exclusiv de diferenţele de histocompatibilitate de *locus* H-2; b) anticorpii serici sînt suficienţi pentru a determina chiar singuri eliminarea măduvei osoase transplantate, fără a fi necesare celulele sensibilizate; c) în cazul ţesutului normal, ca şi în cazul ţesutului tumoral transplantat, este posibil să acţioneze un mecanism citostatic similar, care duce fie la eliminarea ţesutului transplantat, fie la reacţia grefă-contra-gazdă. Datele altor autori (257, 702) au confirmat aceste observaţii.

Iradierea totală împiedică eliminarea precoce a homotransplantului renal la om, permiţînd desfăşurarea funcţiilor acestuia de la 4 pînă la 17 luni (363, 490, 494, 495). La cîine, dozele de radiaţii folosite pentru om şi chiar doze superioare nu prelungesc toleranţa faţă de un homotransplant renal (214, 423), dar această stare se poate induce prin iradiere totală cu doză letală, asociată cu grefă medulară (565). La acest animal, iradierea totală a organismului nu poate suprima eliminarea homotransplantului hepatic (841), dar are efecte favorabile asupra homotransplantului pulmonar (784); de asemenea, homografa de piele, provenind de la donatorul de rinichi, se elimină progresiv în aproximativ 3 luni (495, 614).

Scanned with OKEN Scanner

Doza de 400 r, care reprezintă jumătate din doza limită-mortală la om, pare a fi cea mai recomandabilă pentru amînarea eliminării rinichiului transplantat, pentru că are consecinţe hematologice reversibile (495, 585, 587). Contrar faţă de ceea ce se întîmplă la animale (214, 423), la om, o singură iradiere cu doză totală poate induce o imunotoleranţă prelungită faţă de homotransplant (493). Cu toate că este o metodă eficace, iradierea totală a oamenilor receptori de homotransplante renale prezintă riscuri importante şi este insuficientă pentru a rezolva singură şi total problema eliminării acestora (361, 490, 491, 494, 614, 642); asocierea iradiaţiei cu medicaţia imunosupresoare, permiţînd reducerea dozei de radiaţii, este mai convenabilă şi ca eficacitate în amînarea procesului de eliminare şi ca risc biologic (891).

Iradierea totală la hamsteri (1 500 r) reduce intensitatea reacţiei de „transferare a imunităţii" (731), fenomen care ar putea fi exploatat pentru realizarea unui sistem de tipizare a donatorilor de ţesuturi şi organe. De asemenea, iradierea totală a permis efectuarea unor grefe trofoblastice, de ovar, la şoareci (592, 593).

Iradierea locală peste o anumită doză poate genera ea însăşi nefrita (nefrita de iradiaţie) (167, 214). Eficacitatea iradierii locale asupra toleranţei imunologice a unui homotransplant renal, susţinută de unii autori (511, 574), este pusă la îndoială de Banks şi colab. (41), dar această opinie se bazează pe date obţinute pe cîini, care, pentru motivele arătate mai sus, nu sînt suficient de edificatoare.

În experienţe pe iepuri, McCormick şi colab. (597) nu au reuşit să împiedice eliminarea homogrefelor de piele prin iradiere locală. Matthews şi Dempster (590) au arătat de asemenea că prezenţa Bi^{206} în ganglionii limfatici care drenează o homogrefă de piele înlătură reacţiile de eliminare de tip *second set*. Hume şi colab. (424) sînt de părere, totuşi, că iradierea locală este o acţiune terapeutică raţională. Ea poate contribui la evoluţia favorabilă a transplantului pe două căi: prima cale este distrugerea limfocitelor producătoare de anticorpi, care s-au infiltrat în transplant şi continuă să acţioneze asupra antigenelor epiteliale şi endoteliale; a doua cale este interferenţa producerii de anticorpi prin distrugerea celulelor angajate în transportul antigenelor de la rinichiul transplantat la ganglionii limfatici în care se formează anticorpii. Acest fapt este sugerat de experienţe care arată că iradierea secvenţială a rinichiului este capabilă nu numai să-l protejeze în cursul iradierii, ci şi să amîne distrugerea sa după ce acest tratament a fost întrerupt (424). Există, de altfel, evidenţă asupra existenţei celulelor transportoare de antigen (macrofage) în ţesuturile transplantate.

Pentru a obţine beneficiul maxim asupra homotransplantelor renale se recomandă ca iradierea locală să înceapă în prima zi a transplantării, cu o doză de cel puţin 150 r, repetată de 6 ori într-o perioadă de 10—12 zile (fig. 102). Doze mai mici de radiaţii sau întîrzierea cu 1—2 zile a aplicării lor fac ca tratamentul să fie ineficace.

Iradierea locală s-a folosit şi la bolnavi cu homotransplant renal (425). Prima doză a fost aplicată în primele 24 de ore după operaţie, iar următoarele doze în a 3-a, a 5-a şi a 7-a zi, iradierea după această schemă repetîndu-se în cazurile în care s-a putut detecta iminenţa de eliminare. De aceea, doza totală

Scanned with OKEN Scanner

de radiaţii a variat între 600 şi 1 200 r, majoritatea bolnavilor beneficiind de o doză mai mică de 900 r. Această doză este sub doza minimă, capabilă să producă nefrita de iradiere. Supravieţuirea rinichilor transplantaţi, iradiaţi astfel, aproape 1 an, la 27 de bolnavi atestă eficacitatea metodei cu atît mai mult, cu cît nu s-au folosit substanţe imunosupresoare la toţi aceşti bolnavi.

Daniel şi colab. (193) au folosit iradierea locală pentru a împiedica degenerarea progresivă a cartilajului articular după auto- şi homotransplantarea unor articulaţii la cîine.

Este interesant de semnalat că la şoareci, după iradiere letală, asociată cu administrarea de măduvă hematogenă singenică, capacitatea de a elimina o grefă alogenică de piele se restabileşte înaintea capacităţii de a elimina o grefă tegumentară xenogenică (907). Aceste observaţii au fost interpretate ca expresia existenţei în sistemul imun al mamiferelor a două linii distincte fiziologic de celule competente imunologic.

Utilizarea exclusivă a acestei metode a dus însă şi la eşecuri experimentale şi clinice.

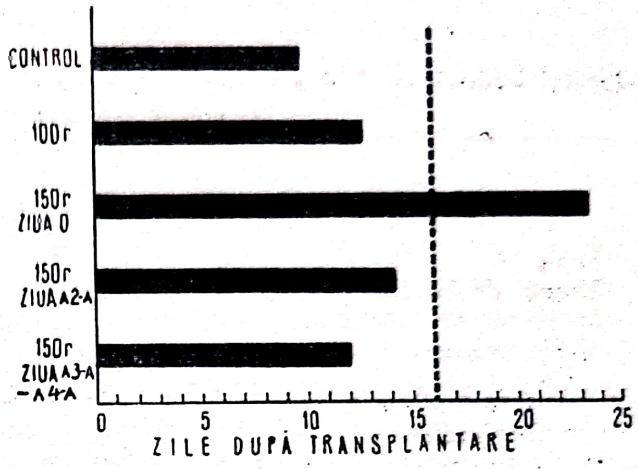


Fig. 102. — Supravieţuirea unor cîini nefrectomizaţi, cu homografă renală, după iradiere locală. Media timpului de supravieţuire a unui grup de cîini nefrectomizaţi a fost de 9,9 zile. Cea mai lungă supravieţuire la acest grup de control a fost de 16 zile. Alte 4 grupuri de animale în situaţie similară aceleia a grupului de control au primit 6 doze de radiaţii asupra rinichiului transplantat. Supravieţuirea cea mai mare (24,3 zile) s-a înregistrat cînd iradierea a început chiar din ziua transplantării. Nu s-a obţinut prelungirea supravieţuirii, dacă doza de iradiere zilnică a fost 100 r [după Hume şi colab. (424)].

Pentru aceeaşi doză de radiaţii, omul prezintă o mortalitate mai ridicată (în ciuda posibilităţilor mai mari de tratament simptomatic) decît şoarecii şi iepurii (495) şi oarecum asemănătoare cu mortalitatea cîinilor (565) şi a primatelor (214, 700). Mortalitatea prin iradiere depinde într-o măsură importantă de condiţiile bacteriologice în care se află ulterior organismul respectiv (ceea ce explică variaţiile înregistrate în cadrul aceleiaşi specii), dar ea recunoaşte ca factor esenţial sensibilitatea „hematologică". Schrek (785) a găsit că limfocitele din sîngele uman sînt sensibile la o iradiere cu raze Röntgen de 10 r, Dougherty şi White (224) au stabilit că limfocitele de şoarece au o sensibilitate cantitativ asemănătoare la aceste radiaţii, iar Stefani şi Schrek (784, 847) şi Ingram şi Mason (432) au stabilit că chiar doze de 2—5 r sînt în măsură să reducă viaţa limfocitelor periferice umane cu 13—21% (tabelul 51). Knowlton [1], pe baza analizei statistice a modificărilor elementelor sanguine la 10 oameni normali expuşi la radiaţii γ (0,2 r), săptămînal, timp de 77 de săptămîni (doza totală 16,21 r), susţine că şi în cazul acestor doze mici se produce o scădere semnificativă a numărului absolut de limfocite. Însă, cantitatea minimă de radiaţii în stare să producă, *in vivo*, un efect semnificativ din punct de

[1] Comunicare personală.

vedere statistic nu s-a stabilit cu certitudine, din cauza dificultăților de a se elimina consecințele acțiunii unor factori străini, cum ar fi modificările de *stress* sau variațiile diurne ale numărului de limfocite.

Aplazia țesuturilor hematopoietice și consecințele sanguine ale administrării unei anumite doze de radiații la om și primate sînt cu totul deosebite de acelea

Tabelul 51

Efectul iradierii cu 2 și 5 r asupra supraviețuirii limfocitelor umane normale, incubate în camere de scurgere sau vase Carrel *

	Camere de scurgere	Vase Carrel	Vase Carrel
Doza (r)	2	2	2
Timpul de incubație (zile)	5	10,6 (m)	11,3 (m)
Numărul de experiențe	5	7	10
Media procentelor de supraviețuire a limfocitelor:			
— fără iradiere	39,2	32,5	32,6
— cu iradiere	34,3	27,3	22,4
Media procentelor de efect (e)	12,90	21,08	34,91
P	0,01	0,05	0,001

m = medie

$$e \text{ (procent de efect)} = \left(1 - \frac{\text{Procent de limfocite care au supraviețuit cu iradiație}}{\text{Procent de limfocite care au supraviețuit fără iradiație}}\right) 100$$

* După Stefani și Schrek (847).

provocate de aceeași doză la rozătoare: intensitatea este mai mare, iar perioada de instalare este mai lungă. Acest ultim caracter, contrar a aceea ce s-ar putea considera *a priori*, este un factor defavorabil, pentru că pe măsură ce perioada de instalare a aplaziei medulare este mai lungă, organismul respectiv este supus mai mult riscurilor infecției și hemoragiei. Diferențele de comportament ale animalelor de specii diverse, cum sînt șoarecele și omul, nu sînt condiționate de diferențele de mărime, pentru că *Tamarinus nigricolis*, un primat de dimensiunile unui cobai, prezintă o sensibilitate hematologică față de iradiație asemănătoare cu aceea a omului [Gengozian, citat de (495)]. Aceste diferențe par a releva proprietăți biologice ale celulelor sanguine și hematopoietice de ordin filogenetic.

Dacă un om iradiat o dată este supus unei a doua iradiații de îndată ce proliferarea mieloidă și limfoidă a ajuns la determinarea unor tablouri hematologice și hematopoietice normale, el răspunde mai violent la această iradiație decît la cea dintîi. O a doua iradiație cu 100 r poate avea consecințe clinice mai grave decît iradiația primară cu 400 r (361, 495) sau chiar decît aplicarea unei doze unice de 500 r (620). Efectul hematologic brutal al unei iradieri secundare nu ar fi putut fi prevăzut pe baza observațiilor efectuate la șoarece și șobolan, la care refacerea țesutului mieloid este rapidă și aproape completă, leziunea reziduală fiind minimă (49, 50, 477, 767, 859).

În folosirea iradierii întregului organism, ca mijloc de suprimare a reacțiilor imunologice de transplantare, a existat tendința de a se impune „homo-

Scanned with OKEN Scanner

genitatea" în distribuirea dozei. În contextul imunității de transplantare ar trebui să se aibă totuși în vedere necesitatea de a folosi iradierea-limită pentru fiecare celulă care se află în producția și transportul anticorpilor.

Cu totul independent de ceea ce ar fi iradierea-limită, necesară sau dezirabilă, a celulelor limfopoietice, formatoare de anticorpi, supraexpunerea, lipsită de orice necesitate, a altor populații celulare ar varia invers proporțional cu gradul uniformității de distribuire a dozei absorbite. Homogenitatea iradiației ar face posibilă, prin urmare, ceea ce se numește „farmacologie internă reproductibilă".

Lipsește totuși o evidență experimentală care să demonstreze că homogenitatea dozei de iradiere *per se* este un fapt *sine qua non* în inducerea toleranței transplantului de organe prin iradiere. Dimpotrivă, o asemenea toleranță poate fi produsă la animalele de laborator prin iradiere cu totul neomogenă. Deoarece efectele imunosupresoare ale iradierii depind, se pare, într-o largă măsură, dacă nu exclusiv, de capacitatea acestui agent de a distruge țesutul limfatic, accentul trebuie pus pe capacitatea dozei de a realiza acest lucru. A accepta de la început omogenitatea dozei de iradiere ca pe un mijloc de a realiza această stare înseamnă a accepta că neomogenitatea dozei este o contraindicație absolută pentru reușita transplantării. În realitate, chestiunea dacă fiecare celulă cu capacitate imunologică trebuie să fie expusă la doza-limită de iradiere pentru a se obține toleranța homo- sau heterotransplantului este o chestiune litigioasă încă (210).

b) **Mecanismul acțiunii imunosupresoare a radiațiilor.** Mecanismul acțiunii radiațiilor asupra producerii de anticorpi este corelat cu efectul lor asupra stadiilor finale ale sintezei acizilor nucleici și asupra sintezei de proteine. Lucrările recente ale lui Goutier și Bacq (330) și Harrington (370) sînt edificatoare în această privință. Radiațiile inhibează încorporarea aminoacizilor în proteine (396, 681). *In vivo,* încorporarea glicinei și lizinei în proteinele nucleare din timusul de șobolan este inhibată după o oră de la iradierea totală cu o doză de radiații de 1 000 r, în timp ce captarea acestor aminoacizi în proteinele citoplasmatice nu este afectată (753). Același fenomen a fost evidențiat și după iradierea *in vitro* a unor nuclei timici (267). Capacitatea unei fracțiuni ribonucleoproteice de a încorpora leucina este abrogată după 4 ore de la iradierea unor celule timice (396), proces care evoluează paralel cu inhibiția activității unor enzime (238).

Înainte de 4 ore de la iradiere, modificările majore în structura nucleilor și a nucleohistonelor sînt ilustrate de apariția unui material care conține ADN în fracțiunile citoplasmatice ale celulelor timice (396). Această observație nu impune însă concluzia că locul inițial al acțiunii radiațiilor asupra celulei este structura nucleohistonelor. Modificarea structurală menționată ar putea fi manifestarea unei dezintegrări a cromatinei, care ar rezulta din pierderea de ioni sau proteine necesare acestor structuri; ea ar putea fi produsă de acțiunea directă a razelor Röntgen sau prin alterarea permeabilității membranei nucleare, așa cum susțin Whitfield și Rixon (949). Este, de asemenea, posibil ca distrugerea structurii nucleohistonice să fie un efect primar, iar modificările consecutive ale activității ribonucleazei (676) și ale activității proteolitice (354) să fie efecte secundare, induse de existența unor produse alterate (prin iradiere) în

Scanned with OKEN Scanner

celulă. Orice modificare a structurii nucleohistonelor ar putea să le facă susceptibile la acţiunea acestor enzime. Hagen (353) a evidenţiat labilizarea ADN în celulele timice la 2 ore după iradiere.

Aceste observaţii, alături de observaţia lui Ficq şi Errera (267), potrivit căreia inhibiţia încorporării aminoacizilor în nuclei după iradiere este parţial reversibilă, dacă în mediul de incubaţie se află ADN, arată că radiaţiile afectează reacţii dependente de ADN. De altfel, Allfrey şi colab. (13) au stabilit precis că încorporarea aminoacizilor în nucleii celulelor timice este dependentă de ADN.

Radiaţiile nu afectează încorporarea leucinei în proteinele ribozomale (396).

c) **Iradierea selectivă a sistemelor imune.** Datele prezentate mai sus demonstrează eficacitatea iradierii externe, totale sau locale, asupra prelungirii supravieţuirii ţesuturilor şi organelor transplantate, dar arată totodată că această metodă nu poate fi aplicată la animalele mari şi la om fără riscul unor complicaţii grave.

Recent, Webber (933) a publicat observaţii interesante privind suprimarea formării anticorpilor anti-γ-globuline la iepuri prin administrarea intravenoasă a unei suspensii de virus al mozaicului tutunului puternic marcat cu I^{131} (doză unică, variind de la 0,5 la 4,4 mc). Suprimarea formării anticorpilor nu se însoţeşte în acest caz de tulburări de iradiaţie.

Această nouă metodă este condiţionată de concentraţia selectivă a antigenelor şi de tropismul lor pentru acele celule care iniţiază producţia de anticorpi.

Wissler (958) a descris o serie de modificări citologice în sistemul reticuloendotelial al şobolanului, după administrarea vaccinului antitific. Antigenul este captat de fagocitele splenice, după care celulele reticulare primitive din apropiere încep să prolifereze. Probabil că aceste celule sînt stimulate de antigenul devenit între timp solubil (celulele reticuloendoteliale fiind înzestrate cu un mecanism de solubilizare a oricărui material străin). Într-o fază următoare, numeroase celule mici, cu afinitate tinctorială mare, formate în splină, sînt eliberate în circulaţie, unde participă, probabil, la procesul producerii anticorpilor.

Locul acţiunii inhibitoare a radiaţiilor în formarea anticorpilor nu a fost stabilit încă. Salerno şi Friedell (770) au ajuns la concluzii interesante, comparînd efectele iradierii interne şi ale iradierii externe. Aceşti autori au injectat intravenos la şobolani Au^{198} şi $Cr^{32}PO$ şi au urmărit ulterior evoluţia anticorpilor anti-eritrocite de oaie la aceşti şobolani. Astfel, ei au constatat că aurul coloidal suprimă producerea anticorpilor, dar doza eficace este de cele mai multe ori letală înainte de a se obţine o inhibiţie a procesului imunologic la fel de intensă ca aceea provocată de iradierea externă. În cazul folosirii izotopului de aur, radioactivitatea maximă se depistează în celulele macrofage şi nu se poate pune în evidenţă în celulele formatoare de anticorpi. Winchell [citat de (933)] a folosit Y^{90}, într-o formă chelatată, pentru iradierea selectivă a sistemului imun. Acest izotop radioactiv se distribuie în lichidul extracelular şi se concentrează în ganglionii limfatici, în care se găseşte în cantităţi de două ori mai mari decît în alte ţesuturi sensibile, cum ar fi mucoasa intestinală. Rezultatul acestei iradieri interne este depresiunea selectivă a limfocitelor.

Iradierea ţesuturilor produsă pe această cale este dependentă de numărul de particule aflate la locul respectiv. Dacă antigenul marcat se acumulează

Scanned with OKEN Scanner

numai într-o anumită celulă şi această celulă reprezintă o anumită componentă a procesului imunologic, atunci un emiţător cuplat la acest antigen, de exemplu un emiţător de raze β, cum este H^3, sau un emiţător de raze α cum este Ast^{211}, este suficient pentru a realiza o iradiere selectivă. Particulele α ale celei din urmă substanţe radioactive au o putere de pătrundere de aproximativ 60 μ. Dacă anticorpii sînt produşi în celule din vecinătatea celulelor în/pe care se fixează antigenul transportor al sursei radioactive, atunci I^{131} este preferabil pentru iradiere, din cauză că el emite radiaţii β cu o putere mai mare de pătrundere. Cele mai puternice raze β (0,6 Mev) au o putere de pătrundere în ţesut de 2 mm şi izotopul respectiv se leagă cu uşurinţă de proteine.

Au fost studiate numeroase antigene care pot fi marcate cu izotopi radioactivi. Aceste studii au arătat că timpul lor de dispariţie din plasma gazdei este variabil. ASB injectată intravenos la iepuri rămîne în circulaţia generală mai multe zile. Dacă se foloseşte, deci, un asemenea antigen, o parte considerabilă din doza totală se distribuie în întregul organism. Alte antigene, ca bacilul tific omorît prin căldură sau virusul mozaicului tutunului, dispar rapid din circulaţie. De exemplu, virusul mozaicului tutunului dispare din circulaţie în cîteva minute (412).

Cercetările mai vechi ale lui Tagliaferro şi Tagliaferro (874) au sugerat faptul că în cazul folosirii iradierii interne pentru a se obţine efectul maxim ar putea fi necesar ca administrarea antigenului marcat cu o sursă de iradiaţie să se facă înainte cu o zi de administrarea antigenului faţă de care se urmăreşte instituirea unei inhibiţii a răspunsului imun. Verificarea acestui fapt a fost făcută de Webber (933).

2. FRIGUL

Studii recente privind efectele expunerii la frig asupra organismelor homeoterme au arătat că acest agent produce modificări ale răspunsului imun. Şobolanii expuşi la frig prezintă o creştere a fracţiunilor α- şi β-globulinice din sînge şi o scădere corespunzătoare a fracţiunii γ-globulinice (808). Rezultate similare au fost obţinute şi din experienţe pe iepuri expuşi la frig (830). La cobaii expuşi la temperaturi joase s-a observat că titrul complementului creşte, la fel ca şi activitatea bactericidă a serului (867).

Pe de altă parte, Trapani şi Campbell (896, 897) au arătat că ritmul distrugerii anticorpilor administraţi pasiv este mai mare la iepurii ţinuţi la —15° decît la iepurii ţinuţi la temperatura camerei, iar Southerland şi Campbell [citaţi de (152)] au demonstrat că frigul are acelaşi efect şi asupra anticorpilor produşi în mod activ.

Modificări ale răspunsului imun prin frig nu se obţin totuşi în orice circumstanţă; frigul nu influenţează, de exemplu, producerea de anticorpi anti-colifag la şoarece (152).

Fegiz şi colab. (259) au folosit refrigerarea rapidă a organismului, în scopul de a obţine toleranţa faţă de homotransplantul pulmonar. Knodo şi colab. (475) au folosit hipotermia în vederea prelungirii viabilităţii homotransplantului cardiac la cîini, iar Andjus şi colab. (20) au transplantat inimi de şobolan după congelarea lor. Couch şi colab. (174) şi Makin şi Howard (553)

Scanned with OKEN Scanner

susţin de asemenea că hipotermia are efect protector asupra homotransplantelor renale, probabil ca urmare a atenuării reacţiei imunologice a receptorului.

În imunitatea de transplantare, frigul nu poate avea însă, potrivit datelor actuale, decît un efect adjuvant.

C. ASPECTE PRACTICE ALE INDUCERII IMUNOTOLERANŢEI

1. TERAPIA IMUNOSUPRESOARE

Tabelele 52—55 ilustrează eficienţa unora dintre cele mai importante substanţe imunosupresoare asupra prelungirii supravieţuirii homografelor la şoarece, iepure, cobai şi cîine şi efectul lor nociv. Aceste tabele, întocmite pe baza a numeroase date, cuprind numai acele substanţe a căror acţiune a fost testată într-o măsură mai mare şi nu cuprind azatioprina şi actinomicinele, medicamentele cele mai larg folosite astăzi în clinică şi α_2-glicoproteinele, medicamentul adoptat recent şi foarte promiţător (457, 634). În legătură cu acestea din urmă s-au prezentat date mai numeroase în secţiunile precedente. Din aceste tabele au fost excluse şi datele privind prevenirea cu ajutorul acestor substanţe a eliminării organelor transplantate la om, din cauza regimului polifarmacodinamic folosit intens în clinică în aceste împrejurări, care pot modifica particularităţile lor de acţiune.

Küss şi colab. (493) consideră că, la om, cea mai potrivită formulă de condiţionare nespecifică a receptorului unui homotransplant este iradierea totală cu doză subletală înainte de transplantare şi 6-MP, asociată cu hormoni corticosteroizi, după transplantare, începînd cu momentul restaurării modificărilor hematopoietice induse de iradiere. Murray (640) este de părere însă că în prezent, singura substanţă imunosupresoare utilă este azatioprina şi că într-o formulă eficace de tratament împotriva eliminării unui homotransplant, această substanţă trebuie să ocupe primul loc, iar prednisona şi AMC al doilea loc (ca adjuvant).

În comentarea datelor din aceste tabele trebuie subliniat numărul surprinzător de redus al unor evaluări directe, precise, asupra eficienţei şi toxicităţii acestor substanţe imunosupresoare peste anumite limite de doză şi anumite moduri de administrare; este evidentă lipsa unor informaţii elementare, cum ar fi informaţiile asupra regimurilor terapeutice optime. Există tendinţa de a utiliza sisteme complexe de tratament, deşi nici unul dintre ele nu a fost explorat în mod adecvat. Acest fapt este foarte pregnant în cazul homotransplantului la cîine, la care obiectivul experimental a fost adesea confundat cu tentaţia de a imita practica clinică (în serii foarte mari de animale numai două au fost tratate la fel).

2. COMPATIBILITATEA DONATOR-RECEPTOR

Grefe schimbate la întîmplare între membrii unei populaţii diverse ca rase au arătat în mod curent că timpul de eliminare variază între limite largi şi că aceste limite sînt mult lărgite de terapia imunosupresoare. În general, cu ajutorul substanţelor imunosupresoare, timpul de supravieţuire a grefelor care se

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 52

Eficienţa şi toxicitatea unor substanţe imunosupresoare la şoarece

Substanţa	Doza (mg/kilo-corp)	Modul de administrare (nr. zile pe săptă-mînă)	Durata tratamen-tului (zile)	Calea de administrare	Letalitatea (%)	Media timpului de supravie-ţuire a grefei în zile (cu limite sau D.S.)		Referinţe
						Martori	Animale tratate	
Cortizon	20—22	7	15	Subcutanat	9,5	10,2±0,9	15	Medawar şi Sparrow (608)
	41—45	7	10—15	Subcutanat	75	—	—	Idem
	50	2	> 300	Subcutanat	0	—	—	Frenkel şi Haven-hill (285)
Ciclofosfamida	50	Alternativ	21	Intraperitoneal	25	10,5(9—12)	16(12—18)	Fox (282)
	50	7	13	Intraperitoneal	38	6,9±0,8	14±2,6	Sutton şi colab. (864)
6-MP	12	7	→	Intraperitoneal	50	10,9±0,35	10,9±0,82	Powell şi colab. (721)
	72	7	10	Idem	0	—(7—11)	12	Meecker şi colab. (609)
	100	7	10	Idem	0	—(7—11)	—(9—12)	Idem
	150	7	10	Idem	15	—(7—11)	—(7—8)	Idem
Metotrexat	4	7	12	Intraperitoneal	23	6,9±0,14	9,7±0,44	Sutton şi colab. (865)
	5	7	12	Idem	20	6,9±0,14	8,3±0,41	Idem
	3	7	35	Idem	80	20,3(18—23)	49,2(47—52)	Skowron-Cendrzak (820)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 53

Eficienţa şi toxicitatea unor substanţe imunosupresoare la iepure

Substanţa	Doza (mg/kilo-corp)	Modul de administrare (nr. zile pe săptă-mînă)	Durata tratamen-tului (zile)	Calea de administrare	Letalitatea (%)	Media timpului de supravie-ţuire a grefei în zile (cu limite sau D.S.)		Referinţe
						Martori	Animale tratate	
Cortizon	1,5	7	→	Intramuscular	—	7	—(25—30)	Berlin şi Peregudov (65)
	3,5—4,5	7	→	Subcutanat	—	7,5 (7—9)	24 (22—27)	Billingham şi colab. (81)
	4	7	→	Intramuscular	100	—(6—12)	28 (14—42)	Morgan (632)
Ciclofosfamida	25	7	→	Intraperitoneal	20	9,7 (9—11)	22,3 (14—46)	Jones şi colab. (445)
	30	7	→	Idem	50	9,7 (9—11)	24 (20—32)	Idem
6-MP	6	7	→	Intravenos	14	14,1—14,7 (11—17)	18,4 (13—27)	Meecker şi colab. (609)
	6	7	→	Intravenos	40	14,4 (11—16)	> 17,5 (15—27)	Meecker şi colab. (610)
	12	7	→	Intravenos	70	14,1 (13—17)	>22 (19—28)	Idem
	12	7	14	Intravenos	10	14,1 (13—17)	24,3 (23—26)	Idem
	12	7	14	Subcutanat	—	6,8 (5—9)	17,8 (8—34)	Schwartz şi Dameshek (794)
	12	Alternativ		Subcutanat	—	6,8 (5—9)	17,8 (8—34)	Idem
Metotrexat	1,5	Alternativ		—	—	Nici un efect asupra timpului de supravieţuire		Brooke (117)
	6	7		Intravenos	Moderată			Meecker şi colab. (609)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 54

Eficienţa şi toxicitatea unor substanţe imunosupresoare la cobai

Substanţa	Doza (mg/kilo-corp)	Modul de administrare (nr. zile pe săptă-mînă)	Durata tratamen-tului (zile)	Calea de administrare	Letalitatea %	Media timpului de supravie-ţuire a grefei în zile (cu limite sau D.S.)		Referinţe
						Martori	Animale tratate	
Cortizon	30—40	7	→	Subcutanat	—	6,5(5—9)	>14,7(12—18)	Sparrow (833)
	285—300	7	12	Subcutanat	0 (în 12 zile)	—	—	Adamkiewicz (3)
Ciclofosfamida	10	6	56	Intraperitoneal	18	12,5 (10—27)	13,2 (10—28)	Berenbaum (61)
	20	6	56	Idem	94	12,5 (10—27)	17,5 (10—28)	Berenbaum (61)
	25	6	43	Idem	100	14,4 (10—27)	22,2 (14—32)	Berenbaum (61)
6-MP	24	7	→	Intraperitoneal	23	9,4±0,36	8,6±0,24	Powell şi colab. (721)
	48	7	→	Idem	67	9,4±0,36	11,2±1,11	Powell şi colab. (721)
	150	5	10	Idem	25	—	—	Spiegelberg şi Miescher (836)
	150	7	10	Idem	75	—	—	
Metotrexat	9	3		Intraperitoneal	13	12,7 (10—28)	24,1 (10—95)	Berenbaum (58)
	12	3		Idem	20	12,7 (10—28)	35,5(10—160)	Berenbaum (58)
	15	3		Idem	69	12,7 (10—28)	22,4 (13—42)	Berenbaum (58)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 55

Eficiența și toxicitatea unor substanțe imunosupresoare la cîine

Substanța	Doza (mg/kilo-corp)	Modul de administrare (nr. zile pe săptă-mînă)	Durata tratamen-tului (zile)	Calea de administrare	Letalitatea (%)	Media timpului de supraviețuire (cu limite sau D.S.)		Referințe
						Martori	Animale tratate	
Cortizon	7—9	7	→	Oral	—	—	7,4 (10—17)*	Dempster (212)
Ciclofosfamida	6—12	7	11—28	Intravenos	33	—	—	White (946)
	10	Alternativ	—	Oral	20	10,4 (6—15)	12 (4—23)*	Reams (740)
	10	7	4	Oral	—	—	8,6 (5—14)*	Zukoski și colab. (979)
	5	7	→	Oral	—	—	8,6 (5—14)*	Idem
6-MP	2—3,8	Variabil	→	Oral	50	—	19,4 (7—42)*	Calne (141)
	3	7	8—12	Oral	25	—	14 (4—70) la 27 din 28 cîini	Pierce și colab. (710)
	3	Alternativ	→	Oral	25	—		Zukoski și colab. (984)
	3	7	4	Oral	30	15 (9—25)	16,9 (7—35)*	Idem
	2	2—3	→	Oral	30	15 (9—25)	23,7(17—66)*	Idem
	5	7	4—9	Intravenos	33	15 (9—25)	23,7(17—66)*	Idem
	2,5	2—3	→	Intravenos	33	15 (9—25)		Idem
Metotrexat	0,1	3	→	Subcutanat	—	13 (10—17)	15 (12—27)	Hechtman și colab. (389)
	0,15—0,50	3	→	Subcutanat	—	13 (10—17)	37 (19—91)	Idem
	0,15—0,25	3	42	Subcutanat	0	—	—	Thomas și colab. (884)

* Homotransplant renal.

Scanned with OKEN Scanner

elimină rapid este prelungit cu puține zile, iar acela al majorității grefelor se poate dubla, aceste efecte avînd o mică importanță practică; prelungirea supraviețuirii grefelor care se elimină încet poate fi însă considerabilă, de ordinul lunilor (de exemplu, rinichiul homotransplantat la bolnavi uremici are o eliminare înceată, chiar fără tratament imunosupresor, în comparație cu eliminarea rinichiului homotransplantat la animale sănătoase). Variațiile mari ale timpului de eliminare a aceluiași țesut sau organ în cadrul aceleiași specii se datoresc într-o mare măsură compatibilității antigenice între donator și gazdă și este de presupus, prin urmare, că rezultatele terapiei imunosupresoare ar beneficia mult de o metodă practicabilă de selectare relativă a combinațiilor donator-receptor (315).

O homografă care a fost menținută în stare bună de funcționare prin tratament imunosupresor poate fi eliminată foarte ușor cînd tratamentul este întrerupt, iar alteori, în aceeași condiție, nu este eliminată de loc. De exemplu, Zukoski și Callaway (976) și Pierce și Varco (708) au prezentat cîini cu homotransplant renal care a funcționat 4—5 luni după sfîrșitul unei perioade de 6—7 luni de tratament cu 6-metil-MP și 6-MP. Condițiile de integrare a acestor homografe nu au fost precizate, dar este probabil că cea mai importantă condiție a fost în aceste cazuri un grad relativ înalt de compatibilitate donator-receptor.

3. TOXICITATEA AGENȚILOR IMUNOSUPRESORI

Spectrul sensibilității țesuturilor și speciilor la un asemenea medicament depinde de numeroși factori, incluzînd modul său de acțiune și proprietățile sale fizico-chimice, calea prin care diferite tipuri de celule sînt interesate și măsura în care aceste celule depind de activitățile afectate de el, adică problema populațiilor celulare sensibile sau insensibile față de un asemenea agent trebuie să fie privită nu numai din unghiul efectului direct, ci și din unghiul relațiilor sale posibile și al efectelor indirecte. De exemplu, diferențele marcate de sensibilitate a variatelor tipuri de celule față de antagoniștii acidului folic au fost corelate cantitativ cu permeabilitatea celulară diferită față de aceste substanțe și cu conținutul sau ritmul diferit de sinteză a reductazei folice (276, 356, 357, 940). De asemenea, măduva osoasă este total inaptă de a sintetiza acid inozinic, elemente cheie în sinteza purinelor (fig. 87), ceea ce o face dependentă de alte țesuturi care-i furnizează purine preformate (498). Acest fapt explică de ce 6-tioguanina, care inhibează încorporarea guaninei preformate, are acțiunea toxică cea mai puternică asupra măduvei osoase (705). Diferențele importante în sensibilitatea diferitelor specii la 6-azauridină sînt explicabile prin diferențele de dependență leucocitară a procesului de conversiune a monofosfatului de orotidină în monofosfat de uridină (fig. 87) (135, 146).

Într-un alt capitol s-a discutat rolul timusului în imunitatea de transplantare și asupra acestei probleme nu se va insista aici. Considerăm necesar a completa însă datele respective cu cîteva aspecte ale relațiilor dintre iradiație și cortizol, pe de o parte, și activitatea timică, pe de altă parte, în scopul de a sublinia importanța afirmațiilor principale de mai sus. În timus s-au descris două feluri de celule: limfocitele, care sînt radiosensibile și celulele reticulare

Scanned with OKEN Scanner

care sînt radiorezistente (456). Aceste tipuri celulare se deosebesc şi din punctul de vedere al sensibilităţii faţă de glucocorticoizi (776). Potrivit datelor lui Herranen şi Brunkhorst (397), Baker şi colab. (37) şi Dougherty (223), tratamentul hormonal interesează într-o anumită măsură şi celulele reticulare, efectul variind cu durata tratamentului şi doza de hormon administrată (cele mai importante modificări se observă după 21 de zile de tratament). Iradiaţia şi tratamentul cu hormoni corticosteroizi îşi sumează efectele asupra timusului.

Aceste observaţii reclamă cercetări suplimentare. Exemplele citate sînt însă suficiente pentru a explica lipsa de paralelism între activitatea imunosupresoare şi toxicitatea generală a unei asemenea substanţe (63) şi pentru a atenua opiniile pesimiste asupra posibilităţii de a se obţine agenţi imunosupresori cu o acţiune strict selectivă.

4. COMBINAŢIILE SINERGICE DE AGENŢI IMUNOSUPRESORI

Inhibiţia prin antimetaboliţi a căilor biochimice de sinteză a purinelor şi pirimidinelor (fig. 87) poate fi depăşită prin acumularea metabolitului (metaboliţilor) dinaintea etapei blocate sau prin intrarea în funcţie a unei căi metabolice alternative, aşa încît efectele antimetabolitului să se atenueze. Prima posibilitate de limitare a acţiunii imunosupresoare ar putea fi evitată prin administrarea simultană a altui antimetabolit care blochează etapa precedentă a aceleiaşi căi metabolice (blocare secvenţială), iar cea de a doua posibilitate prin administrarea simultană a altui antimetabolit care blochează într-o anumită etapă calea metabolică alternativă (blocarea paralelă) (819). În această direcţie a terapiei imunosupresoare s-au efectuat pînă acum investigaţii puţin numeroase. Bieber şi colab. (68) au arătat însă în mod convingător că folosirea unor combinaţii de antagonişti purinici şi pirimidinici este foarte eficientă.

Efectele unui medicament pot fi potenţate uneori prin agenţi care interferează excreţia sau degradarea acestuia. De exemplu, 4-hidroxipirazolo-(3,4-*d*)--pirimidina (un inhibitor al oxidazei xantinice) reduce inactivarea oxidativă *in vivo* a 6-MP şi potenţează acţiunea sa inhibitoare asupra formării de anticorpi şi asupra eliminării organelor şi ţesuturilor transplantate (243, 531).

5. COMBINAŢII DE AGENŢI IMUNOSUPRESORI ŞI AGENŢI DE PROTECŢIE

Unele substanţe, ca cisteina şi glutationul, reduc letalitatea prin iradiere, fără a proteja în mod semnificativ însă celulele competente imunologic de efectele sale (185, 415, 555), dar nu pare să se fi făcut pînă acum vreo încercare de a se aplica această observaţie în vederea prelungirii supravieţuirii unei homografe.

Metaboliţii naturali pot asigura într-o oarecare măsură protecţia faţă de acţiunea toxică a antimetaboliţilor (309, 311). Această protecţie este condiţionată de doză şi durata aplicării medicamentului. Faptul că metaboliţii naturali pot exercita inhibiţii de tip *feed back* asupra etapelor iniţiale ale unui lanţ metabolic complică într-o oarecare măsură posibilităţile de protecţie faţă de agenţii imunosupresori; într-adevăr, în unele cazuri, efectele toxice ale unui antimetabolit pot fi potenţate prin administrarea metabolitului respectiv (124).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă în combinaţiile medicamentoase, modificarea activităţii toxice ar fi paralelă cu modificarea activităţii imunosupresoare, avantajul terapeutic ar fi nul. Din fericire, celulele competente imunologic sau celulele imunologic activate par a suferi leziuni ireversibile mai uşor sau la doze mai mici decît alte tipuri celulare, aşa că folosirea combinată a agenţilor imunosupresori şi agenţilor protectori poate conferi tratamentului o eficacitate mai mare. Acest fapt este subliniat de numeroase observaţii asupra agenţilor radioprotectori sau asupra acţiunii protectoare a acidului folinic la animalele tratate cu antagonişti ai acidului folic.

S-a demonstrat, de exemplu, că şoarecii cu leucemie, care au primit doze letale de aminopterină, pot fi „recuperaţi" prin administrare ulterioară de acid folinic (310). Celulele leucemice s-au dovedit mai puţin capabile de a tolera acest regim, în comparaţie cu celelalte celule ale gazdei şi au fost lezate în mod preferenţial. Mai mult, s-a constatat că la şoareci imunizaţi cu vaccinuri bacteriene şi trataţi cu metotrexat, în scopul de a suprima producţia de anticorpi specifici, administrarea prelungită a acidului folinic reduce toxicitatea metotrexatului, fără a favoriza în mod practic restaurarea capacităţii organismului de a forma anticorpi (64). În mod similar, la cobai purtători de homografe de piele, s-a dovedit că tratamentul prelungit cu acid folinic face posibilă administrarea unor doze masive de metotrexat fără o creştere corespunzătoare a toxicităţii acestuia (efectul asupra celulelor mediatoare ale răspunsului la homografă a fost atestat de supravieţuirea a aproximativ jumătate din grefele de piele efectuate la aceste animale) (59).

O relaţie interesantă între un agent imunosupresor şi un agent protector a fost evidenţiată, de asemenea, între agenţii alchilanţi, pe de o parte, şi catecolamine şi antagonişti ai serotoninei, pe de altă parte. O serioasă limitare a utilizării clinice a agenţilor alchilanţi pentru efectul lor anticanceros sau pentru efectul lor imunosupresor o constituie efectul lor nociv asupra măduvei osoase şi complicaţiile asociate. Introducînd în terapeutica adjuvantă adrenalina şi noradrenalina, White (947) a reuşit să realizeze o protecţie selectivă la animale, iar Field (270, 271) a reuşit să obţină un efect similar la om. Efectele adrenalinei la şoareci, trataţi cu agenţi alchilanţi, de prevenire a morţii şi ameliorare a leucopeniei, sînt optime atunci cînd ea se administrează la cîteva ore după administrarea substanţei alchilante. Un agent antiserotoninic şi anume derivatul pirazolonic *1*-(N-metil-piperidil-*4'*)-*3*-fenil-*4*-benzil-pirazolona, s-a dovedit a fi mult mai eficace decît cele două catecolamine în prevenirea mortalităţii şi ameliorarea leucopeniei la şoareci trataţi cu mecloretamina (azotiperită) (272).

6. RELAŢIA DINTRE VITAMINA A ŞI ELIMINAREA HOMOGREFELOR CUTANATE

Vitamina A joacă un rol important în sinteza mucopolizaharidelor (292). În doze mari, ea provoacă metaplazia mucoasă a unor epitelii şi inhibează keratinizarea normală a altora (261, 421). Prin acţiunea sa asupra lizozomilor, excesul de vitamină A stimulează activitatea enzimelor hidrolitice din celulă (205). Eliberarea acestora se corelează în mod evident cu interacţiunea dintre vitaminele liposolubile şi membranele biologice de natură lipoproteică (538). Enzimele lizozomale par a fi necesare pentru evoluţia normală a proceselor

Scanned with OKEN Scanner

inflamatoare, iar depleţia lor, cum ar fi aceea care urmează administrării unor doze mari de vitamină A, suprimă hipersensibilitatea de tip întîrziat şi reacţia Arthus la cobai (912). Tulburările determinate de tratamentul cu vitamina A se pot obţine în parte prin injectarea de papaină sau prin adaos de enzime proteolitice la culturile celulare (262, 887). Un mecanism proteolitic a fost implicat şi în eliminarea homografelor (95, 659, 706). Hipervitaminoza A accelerează eliminarea homografelor cutanate la iepuri (95, 912). Acest efect este socotit drept consecinţa tulburărilor de vindecare a leziunilor produse de excesul de vitamină A. Acest proces depinde de factori multipli, ca proliferarea fibroblastică, sinteza colagenului, formarea substanţelor fundamentale conţinătoare de mucopolizaharide şi dezvoltarea capilarelor. Eliminarea autografelor de piele la iepurii aflaţi în hipervitaminoză A nu poate fi explicată decît prin interferarea a cel puţin unuia dintre aceşti factori; intervenţia unor factori imunologici este exclusă în acest caz (95, 277). Faptul morfologic cel mai frapant este că la aceste animale nu se stabileşte joncţiunea dintre grefă şi patul său (95), indiferent de sursa grefei (auto- sau homografă).

Insuficienta dezvoltare a ţesutului conjunctiv, bine vascularizat, în zona de joncţiune duce la ischemia grefei după faza iniţială de nutriţie avasculară. Comparînd acest tip de eliminare cu tipul imunologic de eliminare s-ar putea afirma că seamănă cu aşa-numita „grefă albă", în care, după cum s-a subliniat şi într-un capitol precedent, lipsa revascularizării joacă rolul major (52, 75). Realizarea procesului de revascularizare a grefelor de piele poate fi împiedicată prin eliberarea de enzime proteolitice, cu atît mai mult, cu cît aceste enzime afectează şi colagenul dermic şi mucopolizaharidele substanţei fundamentale. În homografare, înlocuirea colagenului grefei se realizează prin procese concomitente de distrugere şi sinteză (295, 340), intervenţia enzimelor proteolitice determinînd evoluţia dominantă spre distrugere. În acest context nu trebuie pierdută din vedere posibilitatea colagenului de a rezista digestiei proteolitice în anumite condiţii (155).

Hipervitaminoza A provoacă scindarea complexelor mucopolizaharide-proteine ale matricei ţesutului conjunctiv (888) şi inhibează sinteza condroitinsulfatului (262). Vitamina A are unele efecte asemănătoare acelora ale cortizonului; formarea capilarelor şi a substanţei fundamentale este alterată la şoarecii trataţi cu cortizon (832). Iradiaţia împiedică de asemenea revascularizarea grefelor cutanate.

Vitamina A în exces are efecte hipocoagulante (hipoprotrombinemie), care ar putea fi incriminate în lipsa de revascularizare a grefelor la iepuri cu hipervitaminoză A; ca urmare a stării de hipocoagulabilitate ar avea loc o depunere deficitară de fibrină în zona de joncţiune a grefei (679).

Există de asemenea alte dovezi în sprijinul acţiunii inhibitoare a vitaminei A asupra neoformaţiei vaselor: a) vascularizarea posttraumatică a corneei are o incidenţă scăzută la iepurii cu hipervitaminoză A (658); b) vitamina A are acţiune nocivă asupra mitocondriilor, reticulului endoplasmic, lizozomilor şi membranelor nucleare (538), a căror integritate funcţională este necesară pentru a avea loc procesul normal al proliferării ţesutului conjunctiv şi a vaselor.

Aceste exemple arată că o terapie imunosupresoare, raţională şi efectivă, trebuie să se sprijine pe cercetarea diferenţelor de sensibilitate celulară la agenţii

Scanned with OKEN Scanner

imunosupresori, a factorilor responsabili pentru aceste diferenţe şi a modului în care ei pot fi utilizaţi pentru o anumită componentă a activităţii lor sau pot fi modificaţi prin măsuri terapeutice, în sensul reclamat de fiecare caz în parte.

7. COMBINAŢIA DINTRE AGENŢII IMUNOSUPRESORI ŞI CIRCULAŢIA ÎNCRUCIŞATĂ CONTROLATĂ SAU NECONTROLATĂ DINTRE DONATOR ŞI RECEPTOR

Blumenstock şi colab. (92) au tratat cu metotrexat cîini cu homografe pulmorare, supuşi de două ori la interval de o săptămînă circulaţiei încrucişate necontrolate cu donatorii respectivi (în care s-a realizat un schimb sanguin între donator şi receptor de 30—50 litri), după metoda lui Egdahl (236) şi au reuşit să menţină în viaţă pe unii dintre ei timp de 24 de luni.

Folosind aceeaşi substanţă imunosupresoare şi transfuzia repetată a unor mici cantităţi de sînge, aceiaşi autori (922) au prelungit supravieţuirea homografei pulmonare la un cîine la peste 26 de luni.

Aceste rezultate au fost obţinute însă numai ocazional şi nu s-a putut stabili cu certitudine semnificaţia lor biologică. Ar putea interveni în aceste cazuri o depresiune suplimentară a răspunsului imun prin expunerea receptorului la acţiunea unor antigene ale donatorului, vehiculate de sînge.

8. IMUNOTOLERANŢA ŞI STAREA FIZIOLOGICĂ

S-a dovedit că insuficienţa renală cronică prelungeşte toleranţa pentru grefele de piele (190). De asemenea s-a dovedit că lipsa de reacţii imunologice dintre mamă şi făt se datoreşte celulelor trofoblastului placentar şi că este posibil ca această funcţie să se altereze în cursul sarcinii (502, 503).

9. TRATAMENTUL RECEPTORILOR DE HOMO- ŞI HETEROTRANSPLANTE RENALE

Schemele de tratamente ale receptorilor de rinichi, donatorii respectivi fiind selecţionaţi dintre rude apropiate cu grup sanguin compatibil, sînt foarte asemănătoare.

Preoperator se practică, de la caz la caz, una sau mai multe hemodialize sau dialize peritoneale.

S-a renunţat la iradierea totală prealabilă a organismului, dar se fac iradieri locale (100—200 r) la nivelul splinei şi/sau al regiunii în care urmează a fi plasat rinichiul transplantat.

După operaţie, bolnavii se îngrijesc în servicii speciale, care să ofere oarecare condiţii de izolare. În general, nu se utilizează în mod profilactic antibioticele, dar se folosesc în infecţiile urinare postoperatorii sau în alte infecţii, potrivit sensibilităţii germenilor implicaţi în aceste infecţii.

În primele 24—48 de ore, hidratarea şi nutriţia bolnavilor se asigură pe cale intravenoasă, ulterior *per os*. Se administrează suplimente de sodiu şi potasiu numai dacă aceşti electroliţi se pierd prin urină în cantităţi excesive;

Scanned with OKEN Scanner

o anumită cantitate de sodiu se prescrie sub formă de bicarbonat, pentru a menține concentrația de bicarbonat în lichidul extracelular. Rația de proteine se reduce la 20 g/zi, chiar dacă azotul ureic sanguin nu prezintă valori mari, iar aportul total de lichide se reduce în mod corespunzător cînd debitul urinar este scăzut.

Hemodializa postoperatoare nu se practică decît dacă este reclamată imperios de evoluția bolnavului, ceea ce se întîmplă în proporție mai mică de 10%.

Administrarea substanțelor imunosupresoare se începe cu cîteva ore înainte de operație și se efectuează după aceea în mod continuu, cu variații de doză conforme evoluției bolnavului. Dozele de substanțe imunosupresoare, care se utilizează în mod curent, au fost prezentate mai înainte. Pentru exemplificare redăm modul de administrare de durată a imuranului. În prima săptămînă, imuranul se administrează în doză medie de 3—5 mg/kilocorp/zi; în săptămînile următoare, doza de imuran se ajustează potrivit numărului de leucocite și trombocite, testelor funcționale ale transplantului renal și stării generale a bolnavului. Dacă funcția transplantului renal este satisfăcătoare și nu există nici un semn de iminență de eliminare, doza de imuran se poate reduce pînă la cantități care să permită refacerea numărului de leucocite la 3 000—5 000/mm^3 și menținerea sa la acest nivel. Dacă însă apar semnele iminenței de eliminare a transplantului renal (scădere de durată a debitului urinar, creșterea azotului ureic în sînge, reducerea *clearance*-ului de creatinină, creșterea excreției urinare o proteinelor, modificarea sedimentului urinar), doza de imuran poate fi crescută chiar peste 5 mg/kilocorp/zi sau, ceea ce este mai recomandabil, se poate asocia tratamentului normal cu imuran tratamentul suplimentar cu AMC (4—8μ g/kilocorp/zi, administrată în perfuzie foarte lentă și repetată, eventual, la fiecare 10 zile) sau cu prednisonă în cantități foarte mari (de exemplu, 700 mg în 3 zile).

Această schemă de tratament se utilizează și în cazul în care rinichiul a fost prelevat de la cadavru. În acest caz se recomandă însă unele modificări: a) plasarea la bolnav a unui *shunt, à demeure,* înainte de transplantarea rinichiului, cu scopul de a se înlesni efectuarea unor hemodialize, preoperator, pînă la găsirea donatorului corespunzător și, postoperator, dacă rinichiul transplantat își reia lent funcția (cum se întîmplă frecvent în acest caz din cauza necrozei tubulare ischemice); b) efectuarea concomitentă a splenectomiei, care înlocuiește iradierea preoperatorie a splinei; c) administrarea suplimentară *ab initio* a prednisonei în doze moderate; d) iradierea locală a transplantului dacă apar semnele iminenței de eliminare.

Alte scheme de tratament preconizează folosirea AMC ca agent imunosupresor major, care se administrează intravenos într-o singură doză (400 μg), în ziua transplantării. Ulterior, se efectuează un tratament cu AMC, imuran și hidrocortizon, în următoarele doze: AMC — 200 μg/zi (4—8 μg/kilocorp/zi), imuran — 2,5—3 μg/kilocorp/zi și hidrocortizon — 0,6—1,2 g/zi. Iradierea locală (a homotransplantului renal) cu o sursă de cobalt este prevăzută în această schemă terapeutică după 9, 13 și 17 zile de la operație (150—200 r/ședință, adică în total 450—600 r). Presiunea arterială a bolnavilor se controlează cu metil-DOPA, iar trombocitopenia și hemoragiile digestive reclamă întreruperea tratamentului cu această asociere de substanțe imunosupresoare.

Scanned with OKEN Scanner

Evident că aceste scheme de tratament se vor abroga o dată cu posibilitatea de a induce în mod specific imunotoleranța față de antigenele tisulare ale donatorului înainte de transplantare; acest fapt va face posibilă chiar și utilizarea cu succes a heterotransplantelor renale.

BIBLIOGRAFIE

1. Absolon K. B., Lenhardt H. F. — *Transplant. Bull.*, 1960, I, 411.
2. Acs G., Reich E., Valanji S. — *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) 1963, *76*, 68.
3. Adamkiewicz V. W. — *Rev. canad. Biol.*, 1957, *16*, 96.
4. Adamson R. H., Fouts J. R. — *Cancer Res.*, 1961, *21*, 667.
5. Adamson R. H., Loo T. L., Morris H. P. — *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.), 1962, *111*, 566.
6. Adler F. L. — *J. Immunol.*, 1957, *78*, 201.
7. Adler F. L. — *Progr. Allergy.*, 1963, 8, 41.
8. Akoev I. G., Lagun M. A. — *Med. Radiol.* (Mosk.), 1963, 8, 47.
9. Albert M. D., Bucher N. L. R. — *Cancer Res.*, 1960, *20*, 1 514.
10. Alexander J. — *Protoplasma*, 1931, *14*, 296.
11. Alexandre G. P. J., Murray J. E., Dammin G. J., Nolan B. — *Transplantation*, 1963, 1, 432.
12. Allfrey V. G., Mirsky A. E. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1963, *28*, 247.
13. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Osawa S. — *J. gen. Physiol.*, 1957, *40*, 451.
14. Amiel J. L. — *Med. Radiol.* (Mosk.), 1962, *7*. 64.
15. Amiel J. L., Mathé G., Pays M. — *Rev. franç. Étud. clin. biol.* 1961, 6, 453.
16. Amos D. B. — *Brit. J. exp. Path.*, 1953, *34*, 464.
17. Amos D. B., Gorer P. A., Mikulska Z. B. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1955, *144*, 369.
18. Amos D. B., Gorer P. A., Mikulska Z. B., Billingham R. E., Sparrow E. M. — *Brit. J. exp. Path.*, 1954, *35*, 203.
19. Amos H. — *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 1964, *80*, 289.
20. Andjus R. K., Rajenski V., Pavlovic-Hournac M. — *J. Physiol.* (Paris), 1962, *54*, 272.
21. André J., Schwartz R., Mitus W. J., Dameshek W. — *Blood*, 1962, *19*, 313.
22. André J., Schwartz R., Mitus W. J., Dameshek W. — *Blood*, 1962, *19*, 334.
23. Andrews B. F., Thomson J. W. — *Pediatrics*, 1962, *29*, 500.
24. Annenkov G. A. — *J. Microbiol. Epidem. Immunobiol.*, 1957, 28, 484.
25. Argyris B. F. — *Transplantation*, 1965, 3, 618.
26. Argyris B. F. — *Transplantation*, 1965, 3, 350.
27. Arnold P. — *Amer. J. Nurs.*, 1963, 63, 83.
28. Askonas B. A., Farthing C. D., Humphrey J. H. — *Immunology*, 1960, *4*, 336.
29. Askonas B. A., White R. G. — *Brit. J. exp. Path.*, 1956, *37*, 61.
30. Attardi G., Colin M., Horibata K., Lennox E. — *J. Immunol.*, 1964, *92*, 325.
31. Bach F., Hirschhorn K. — *Science*, 1964, *143*, 813.
32. Bagdasarov A. A., Sukiasian G. V., Bogoiavlenskaia M. B., Kozinets G. I., Iliuhin A. V., Raushenbah M. S. — *Med. Radiol.* (Mosk.), 1962, 2, 68.
33. Bagdasarov A. A., Sukiasian G. V., Novikova M. N., Raushenbah M. O. — *Med. Radiol.* (Mosk.), 1961, 6, 26.
34. Bain B., Vas M. R., Löwenstein L. — *Blood*, 1964, *23*, 108.
35. Baker R., Gordon R. — *Surgery*, 1955, 32, 820.
36. Baker R., Gordon R., Huffer G., Miller G. M. — *Arch. Surg.*, 1952, *65*, 702.
37. Baker B. L., Ingle D. J., Li C. H. — *Amer . J. Anat.*, 1951, *88*, 313.
38. Baldwin D. S., McLean P. G., Charrir H., Goldring W. — *Arch. intern. Med.*, 1953, *92*, 162.
39. Balner H., Dersjant H., Rood J. J. van — *Transplantation*, 1965, *3*, 230.
40. Balner H., Dersjant H., Rood J. J. van. — *Transplantation*, 1965, *3*, 402.
41. Banks D., Auburn R. P., Hubay C. A., Persky L. — *J. Urol.*, 1961, *86*, 181.
42. Bardawil W. A., Toy B. L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, *80*, 197.
43. Barnes B. A., Flax M. H. — *Transplantation*, 1964, *2*, 343.
44. Barnes D. W. H., Loutit J. F. — *Nucleonics*, 1954, *12*, 68.
45. Barr M. și Llewellyn-Jones M. — *Brit. J. exp. Path.*, 1955, *36*, 147.
46. Barth G. — *Dtsch. med. Wschr .*, 1961, 86, 1 331.

Scanned with OKEN Scanner

663. Nichol C. A., Welch A. D. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1950, *24*, 403.
664. Nicholas J. S. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1932, *30*, 1 111.
665. Nicholas J. S. — *Anat. Rec.*, 1934, *58*, 387.
666. Nicol T., Bilbey D. L. J. — *Nature* (Lond.), 1958, *182*, 606.
667. Nicolau C. T., Apăteanu V., Grigoriu G. — *Stud. Cercet. Med. intern.*, 1962, *3*, 641.
668. Nismann B., Pelmont J., De Mailly J., Yapo A. — *C. R. Acad. Sci.* (Paris), 1963, *256*, 523.
669. Nossal G. J. V. — *Immunology*, 1963, *3*, 163.
670. Nossal G. J. V., Fefer A., Măkală O. — Mechanism of Immunological Tolerance (M. Hašek, A. Lengerová, M. Vojtiskova), Czech. Acad. Sci., Praga, 1962, p. 151.
671. Nossal G. J. V., Măkală O. — *J. Immunol.*, 1962, *83*, 604.
672. Nossal G. J. V., Măkală O. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1962, *16*, 53.
673. Noteboom W. D., Gorski J. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), 1963, *50*, 250.
674. O'Brien T. F. — *Fed. Proc.*, 1961, *50*, 27.
675. Oetgen H. F., Clifford P., Burkitt D. — *Cancer Chemother. Res.*, 1963, *28*, 25.
676. Okada S., Gordon E. R., King R., Hemplelmann L. H. — *Arch. Biochem.*, 1957, *20*, 469.
677. Okada Y., Yagura T., Matsuoka Y., Yamamura Y. — *J. Biochem.*, 1964, *55*, 352.
678. Oliverio V. T., Davidson J. D. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1962, *137*, 76.
679. O'Meara R. A. Q. — *Arch. Vecchi*, 1960, *31*, 365.
680. Orbach-Arbouys S., Eyquem A. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, *100*, 395.
681. Ord M. G., Stocken L. A. — The Biological Lesion *in vivo* and *in vitro* from Mechanisms in Radiobiology, vol. 1, Ed. Academic Press, New York, 1961, p. 259.
682. Ortega L. G., Mellors R. C. — *J. exp. Med.*, 1957, *106*, 627.
683. Osborne E. O., Jordan J. W., Hoak F. C., Pschierer F. J. — *J. Amer. med. Ass.*, 1947, *135*, 1 123.
684. Ottoman R. E., Langdon E. A., Rochlin D. B., Smart C. R. — *Radiology*, 1963, *81*, 1 014.
685. Owe E., Linder A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *99*, 680.
686. Owen R. D. — *Science*, 1945, *102*, 400.
687. Page A. R., Condie R. M. — *Fed. Proc.*, 1961, *20*, 160.
688. Park W. W. — *J. Path. Bact.*, 1958, *75*, 257.
689. Parsa P., Faber L. P., Straub E. W., Beattie E. J. — *Dis. Chest.*, 1964, *45*, 365.
690. Parsons F. M., Markland C., Raper F. P., Fox M. — *Brit. med. J.*, 1963, *1*, 930.
691. Paul J., Struthers M. G. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1963, *11*, 135.
692. Pauling L. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1940, *62*, 2 643.
693. Payne R., Hackel E. — *Amer. J. hum. Genet.*, 1961, *13*, 306.
694. Payne R., Rolfs M. R. — *J. clin. Invest.*, 1958, *37*, 1 756.
695. Peer L. A., Bornhard W., Walter W. C. — *Amer. J. Surg.*, 1958, *95*, 239.
696. Peer L. A., Walie I. S., Pullen R. — *Transplant. Bull.*, 1960, *26*, 115.
697. Pendic B. — Diagnosis and Treatment of Acute Radiation Injury, Ed. W. H. O., Geneva 1961, p. 67.
698. Penman S., Scherer K., Becker Y., Darnell J. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), 1963, *49*, 654.
699. Perez R., Gluckmann A. — *France med.*, 1963, *26*, 355.
700. Perman V., Croukite E. P., Bond V. P., Sorensen D. K. — *Blood*, 1962, *19*, 724.
701. Perry R. P. — *Exp. Cell. Res.*, 1963, *29*, 400.
702. Petrov I. R., Ilinskaia I. V., Astrahova T. N. — *Vestn. Akad. med. Nauk*, 1961, *16*, 63.
703. Philips F. S., Hopkins F. H., Freeman M. L. A. — *J. Immunol.*, 1947, *55*, 289.
704. Philips F. S., Schwartz H. S., Sternberg S. S., Tan C. T. C. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *89*, 348.
705. Philips F. S., Sternberg S. S., Hamilton L. D., Clarke D. A. — *Cancer*, 1956, *9*, 1092
706. Pick E., Cohen J., Nelken D., Bitterman W. — *Nature* (Lond.), 1964, *202*, 504.
707. Pierce J. C., Varco R. L. — *Lancet*, 1962, *1*, 781.
708. Pierce J. C., Varco R. L. — *Surgery*, 1963, *54*, 124.
709. Pierce J. C., Varco R. L. — *Dis. Chest.*, 1964, *45*, 167.
710. Pierce J. C., Varco R. L., Good R. A. — *Surgery*, 1961, *50*, 186.
711. Pierro L. J. — *J. exp. Zool.*, 1961, *147*, 203.

Scanned with OKEN Scanner

856. Stevens K. M. — Mechanisms of hypersensitivity (J. H. Shaffer, G. A. Logrippo M. W. Chase), Ed. Little-Brown, New York, 1959, p. 634.
857. Stoerk H. C. — Mechanisms of hypersensivity (J. H. Shaffer, G. A. Logrippo, şi M., V. Chase), Ed. Little-Brown, New York, 1959, p. 623.
858. Stone W. H., Owen R. D. — *Transplantation*, 1963, *1*, 107.
859. Storer J. B. — *Radiat. Res.*, 1961, *14*, 206.
860. Sugiura K. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *89*, 368.
861. Surmont J., Tubiana M., Lalanne C. M. — *J. Radiol. Electrol.*, 1960, *41*, 799.
862. Surmont J., Tubiana M., Lalanne C. M. — *Chron. Org. mond. Santé*, 1961, *15*, 468.
863. Suskind R. G. — *Fed. Proc.*, 1964, *23*, 442.
864. Sutton W. R., Griffith H. B., Preston F. W. — *Surg. Forum*, 1961, *12*, 117.
865. Sutton W. T., Van Hagen F., Griffith H. B., Preston F. W. — *A.M.A. Arch. Surg.*, 1963, *87*, 840.
866. Suzuki D. T. — *Canad. J. Genet. Cytol.*, 1963, *5*, 482.
867. Szemere G. A., Bodi A., Csik L. — *Acta Biol. Acad. Sci. hung.*, 1959, *9*, 429.
868. Szenberg A., Warner N. L., Burnett F. M., Lind P. E. — *Brit. J. exp. Path.*, 1962 *43*, 129.
869. Szillard L. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1960, *46*, 293.
870. Szirmai E. — *Z. ges. inn. Med.*, 1963, *18*, 37.
871. Taliaferro W. H. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *69*, 745.
872. Taliaferro W. H., Taliaferro L G. — *J. infect. Dis.*, 1948, *82*, 5.
873. Taliaferro W. H., Taliaferro L. G. — *J. Immunol.*, 1951, *66*, 181.
874. Taliaferro W. H., Taliaferro L. G. — *J. infect. Dis.*, 1954, *95*, 134.
875. Talwar G. P., Panda N. C., Sarin G. S., Tolani A. J. — *Biochem. J.*, 1962, *82*, 173.
876. Talwar G. P., Segal S. J. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1963, *50*, 226.
877. Tamaoki T., Mueller G. C. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1962, *9*, 451.
878. Tan C. T., Golbey R. B., Wollner C. A., Hackethal I. A., Murphy M. L., Dargeon H. W., Burchenal J. H. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, *89*, 426.
879. Tata J. R., Ernster L., Lindberg O., Arrhenius E., Pedersen Hedman R. — *Biochem. J.*, 1963, *86*, 408.
880. Temin H. M. — *Virology*, 1963, *20*, 577.
881. Terasaki P. J., Longmire W. B., Cannon J. A. — *Transplant. Bull.*, 1957, *4*, 112.
882. Terasaki P. J., Mandell M., van de Water J., Edgington T. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *120*, 320.
883. Terres G., Hughes W. L. — *J. Immunol.*, 1960, *83*, 459.
884. Thomas E. D., Baker J. A., Ferrebee J. W. — *J. Immunol.*, 1963, *90*, 324.
885. Thomas E. D., Collins J. A., Herman E. C., Ferrebee J. W. — *Blood*, 1962, *19*, 217.
886. Thomas E. D., Kasakura S., Cavins J. A., Ferrebee J. W. — *Transplantation*, *1*, 571.
887. Thomas L. — *J. exp. Med.*, 1956, *104*, 245.
888. Thomas L., McCluskey R. T., Potter J. L., Weissmann G. — *J. exp. Med.*, 1960. *111* 705.
889. Thomson J. D., Austin R. W. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1962, *111*, 121.
890. Thorbecke G. J., Siskind W., Goldberger N. — *J. Immunol.*, 1961, *87*, 147.
891. Titus J. L., Shorter R. G., Payne W. S. — *Med. Clin. N. Amer.*, 1964, *48*, 1 089.
892. Todd R. S., Laine J. B., Howard J. M., Singh L. M., Vega R. E. — *Surg. Forum*, 1963, *14*, 501.
893. Toolan H. W. — *J. nat. Cancer. Inst.*, 1953, *14*, 745.
894. Toolan H. W. — *Cancer Res.*, 1957, *17*, 707.
895. Toolan H. W. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, *73*, 546.
896. Trapani I. L., Campbell D. H. — *J. appl. Physiol.*, 1959, *14*, 424.
897. Trapani I. L., Campbell D. H. — *Fed. Proc.*, 1960, *19*, suppl. 5/I, 109.
898. Trentin J. J., Fahlberg W. J. — Conceptual Advances in Immunology, Ed. Hoeber, New York, 1963, p. 66.
899. Trentin J. J., Session J. — Mechanism of Immunological Tolerance (M. Hašek, A. Lengerová, M. Vojtiskova), Ed. Czech. Acad. Sci., 1962, p. 31.
900. Tubiana M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, *114*, 146.
901. Tubiana M., Lalanne C. M., Surmont J. — *Proc. roy. Soc. Med.*, 1961, *54*, 1 143.
902. Tubiana M., Lalanne C. M., Surmont J. — Diagnosis and Treatment of Acute Radiation Injury, Ed. O.M.S. Geneva, 1961, p. 237.